

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

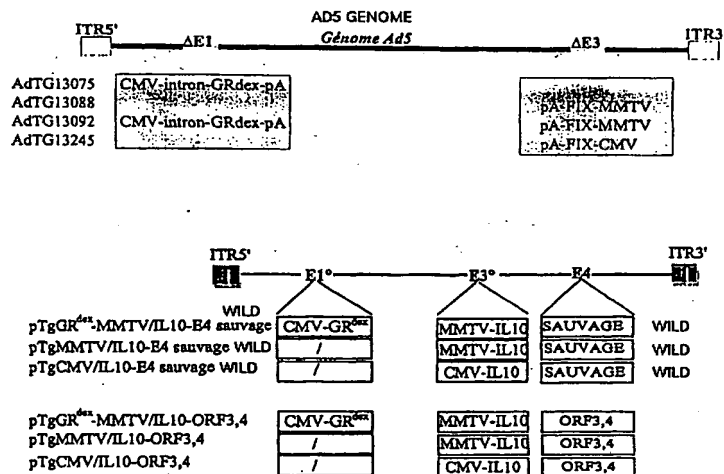
(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>C12N 15/861, 15/62, 5/10, A61K 48/00</b>	<b>A2</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/12741</b> (43) Date de publication internationale: 9 mars 2000 (09.03.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02051</p> <p>(22) Date de dépôt international: 27 août 1999 (27.08.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/10842 28 août 1998 (28.08.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MEHTALI, Majid [FR/FR]; 16, Impasse de Reims, F-67400 Illkirch-Graffenstaden (FR). SORG-GUSS, Tania [FR/FR]; 3, Impasse du Ruisseau, F-67330 Dossenheim sur Zinsel (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</p>	

(54) Title: INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEM

(54) Titre: SYSTEME D'EXPRESSION INDUCTIBLE

(57) Abstract

The invention concerns an inducible expression system using nucleotide sequences coding for a transcriptional activator of eukaryotic or viral origin and a recombinant adenoviral vector comprising a gene of interest placed under the control of a promoter inducible *in trans* by said transcriptional activator. The invention also concerns a recombinant adenoviral vector bearing a first expression cassette coding for a transcriptional activator and a second cassette bearing a gene of interest placed under the control of a promoter inducible *in trans* by said transcriptional activator. The invention further concerns an infectious viral particle, its preparation method, a eukaryotic cell and a pharmaceutical composition comprising such a vector or expression system as well as their use for therapeutic or prophylactic purposes.



(57) Abrégé

La présente invention concerne un système d'expression inductible mettant en oeuvre les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel d'origine eucaryote ou virale et un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur transcriptionnel. Elle a également pour objet un vecteur adénoviral recombinant portant une première cassette d'expression codant pour un activateur transcriptionnel et une seconde cassette portant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur transcriptionnel. L'invention a également trait à une particule virale infectieuse, son procédé de préparation, une cellule eucaryote et une composition pharmaceutique comprenant un tel vecteur ou système d'expression ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques ou prophylactiques.

# UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## SYSTEME D'EXPRESSION INDUCTIBLE

La présente invention concerne un système d'expression inductible mettant  
5 en oeuvre les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel  
et un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le  
contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur transcriptionnel  
sous une forme activée. Elle a également pour objet un vecteur adénoviral  
recombinant portant une première cassette d'expression codant pour ledit  
10 activateur transcriptionnel et une seconde cassette portant un gène d'intérêt placé  
sous le contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur  
transcriptionnel. L'invention a également pour objet une particule virale  
infectieuse, une cellule, une composition pharmaceutique comprenant un tel  
vecteur ou système d'expression ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques  
15 ou prophylactiques. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des  
perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

La thérapie génique se définit comme le transfert d'information génétique  
dans une cellule ou un organisme hôte. Le premier protocole appliqué à l'homme  
a été initié aux Etats Unis en septembre 1990 sur un patient génétiquement  
20 immunodéficient en raison d'une mutation affectant le gène codant pour l'Adénine  
Désaminase (ADA). Il s'agissait de corriger ou remplacer le gène défectueux dont  
le dysfonctionnement est à l'origine d'une maladie génétique par un gène  
fonctionnel. Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le  
développement de cette technologie qui a été depuis étendue au traitement d'autres  
25 maladies aussi bien génétiques qu'acquises (cancers, maladies infectieuses comme  
le SIDA...) dans le but de délivrer *in situ* des gènes thérapeutiques améliorant la  
pathologie. La plupart des stratégies utilisent des vecteurs pour véhiculer le gène  
thérapeutique vers sa cible cellulaire. De nombreux vecteurs tant viraux que  
synthétiques ont été développés au cours de ces dernières années et ont fait l'objet

de nombreuses publications accessibles à l'homme du métier.

L'intérêt des adénovirus à titre de vecteurs de thérapie génique a déjà été évoqué dans de nombreux documents de l'art antérieur. Ils infectent de nombreux types cellulaires, aussi bien des cellules en division que quiescentes, sont non  
5 intégratifs et peu pathogènes. En outre, ils possèdent un tropisme naturel pour les voies respiratoires. Ces propriétés particulières font des adénovirus des vecteurs de choix pour de nombreuses applications thérapeutiques et même vaccinales. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une molécule d'ADN linéaire et bicaténaire d'environ 36 kb qui porte une trentaine de gènes intervenant dans le  
10 cycle viral. Les gènes précoces (E1 à E4 ; E pour early en anglais) sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome. Les régions E1, E2 et E4 sont essentielles à la réplication virale alors que la région E3 impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire anti-adénovirus chez l'hôte ne l'est pas. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late signifiant tardif en anglais) codent majoritairement pour les  
15 protéines de structure et recouvrent en partie les unités de transcription précoces. Ils sont pour la plupart transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais). En outre, le génome adénoviral porte à ses extrémités des régions agissant *en cis* essentielles à l'encapsidation constituées de séquences terminales inversées (ITR) situées aux extrémités 5' et 3' et d'une région  
20 d'encapsidation qui suit l'ITR 5'.

Les vecteurs adénoviraux actuellement utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont dépourvus de la majeure partie de la région E1 afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. Des délétions supplémentaires dans la région E3 permettent d'accroître les capacités de clonage.  
25 Les gènes d'intérêt sont introduits dans l'ADN viral à la place de l'une ou l'autre région déletée. Cependant, l'immunogénécité potentielle des protéines virales encore exprimées peut dans certaines applications particulières s'opposer à la persistance des cellules transduites et à l'expression stable du transgène. Ces inconvénients ont justifié la construction de vecteurs de nouvelles générations qui

conservent les régions *en cis* (ITRs et séquences d'encapsidation) essentielles à l'encapsidation mais comportent des modifications génétiques supplémentaires visant à supprimer l'expression *in vivo* de la plupart des gènes viraux (voir par exemple la demande internationale WO94/28152). A cet égard, un vecteur dît  
5 minimal, déficient pour l'ensemble des fonctions adénovirales représente une alternative de choix.

La plupart des vecteurs développés à l'heure actuelle sont basés sur une expression constitutive du transgène. Or il peut être souhaitable de limiter l'expression du gène thérapeutique à un nombre restreint de types cellulaires.  
10 L'expression tissu-spécifique peut être médiée par le biais de promoteurs et d'enhancers tissu-spécifiques ou de systèmes d'expression inductibles répondant à un événement cellulaire ou temporel spécifique.

De nombreux systèmes d'expression inductibles proposés actuellement reposent sur l'emploi de promoteurs régulés par des facteurs de transcription endogènes activés par un ligand inducteur particulier (hormones stéroïdes, interféron, métaux lourds...). Un premier inconvénient est que ces systèmes  
15 nécessitent la présence des facteurs activateurs endogènes au sein de la cellule cible. De plus, le niveau d'expression basal est souvent élevé en raison d'une activation «bruit du fond» due aux substances cellulaires endogènes, qui peut  
20 générer des effets secondaires non négligeables.

Un certain nombre de systèmes d'expression basés sur l'utilisation de facteurs procaryotiques ont été mis en évidence au cours de ces dernières années. On peut citer par exemple ceux des opérons bactériens tétracycline (Gossen et Bujard, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547-5551), lactose (Miller et  
25 Reznikoff (Eds), The operons, Cold Spring Harbor Laboratory), tryptophane (Yanofsky et al., 1981, Nucleic acids Res. 9, 6647-6668), de la protéine 16 du virus simplex de l'herpès (protéine *trans*-activatrice VP16), ou de la protéine Gal4 de levure (Webster et al., 1988, Cell 52, 169-178).

D'une manière générale, l'opéron de résistance à la tétracycline est codé par

le transposon Tn10 (Hillen et al., 1984, J. Mol. Biol. 172, 185-201). La régulation est assurée par une courte séquence nucléotidique dite "opérateur" (tet O) qui constitue un site de fixation de divers régulateurs. Ainsi, la fixation du répresseur tétracycline (tet R) ou de l'antibiotique tétracycline diminue considérablement le niveau de transcription. Au contraire, un effet d'activation est obtenu en mettant en oeuvre une protéine, désignée dans la littérature "trans-activateur tétracycline (tTA)" qui résulte de la fusion entre le tet R et les 130 acides aminés C-terminaux du domaine d'activation de la protéine VP16 du virus simplex de l'herpès. L'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de plusieurs copies de tet O en amont de séquences de base de la transcription (TATA box, site d'initiation de la transcription..) est détectable par co-expression du tTA et inhibée par ajout de tétracycline. La Tétracycline lie le tTA et empêche ainsi la transcription. Ce système est fonctionnel dans un contexte vecteur rétroviral (Paulus et al., 1996, J. Virol. 70, 62-67) et adénoviral (Neering et al., 1996, Blood 4, 1147-1155 ; Yoshida and Hamada, 1997, Biochem. Biophys. Comm. 230, 426-430 ; Massie et al., 1998, J. Virol. 72, 2289-2296). Dans ce dernier cas, le trans-activateur est fourni *en trans* soit par infection d'une lignée établie exprimant le tTA par un vecteur adénoviral contenant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'éléments *tetO* et du promoteur CMV soit par co-infection des cellules par deux vecteurs adénoviraux, l'un contenant la cassette d'intérêt et l'autre exprimant le tTA. Un système réverse dans lequel l'expression du transgène est activée en présence de la tétracycline, a été développé en mutant la protéine de fusion tTA (Gossen et al., 1995, Science 268, 1766-1769). La protéine modifiée rtTA ne lie en effet les éléments *tetO* qu'en présence de tétracycline. Une autre variante selon laquelle l'expression est contrôlée à deux niveaux (en absence de tétracycline et en présence d'oestradiol), est obtenue en fusionnant le tTA au domaine de liaison au ligand du récepteur aux oestrogènes (Iida et al., 1996, J. Virol. 70, 6054-6059).

Un autre système inductible repose sur l'emploi de récepteurs endogènes afin de remédier à l'immunogénicité potentielle des trans-activateurs

procaryotiques. A cet égard, les récepteurs des hormones stéroïdes ont fait l'objet de nombreuses publications. On peut citer plus particulièrement les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) (Israël et Kaufman, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17, 4589-4604), à la progestérone (PR) (Gronemeyer et al., 1987, *EMBO J.* 6, 3985-3994) et aux oestrogènes (ER) (Klein-Hitpaß et al., 1986, *Cell* 46, 1053-1061 ; Koike et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15, 2499-2513). Leur mode d'action est variable puisqu'ils sont capables de trans-activer ou de trans-réprimer la transcription selon la cellule cible, le ligand hormonal et les éléments de régulation employés. Pour ce qui est de la trans-activation, le récepteur stéroïdien est sous sa forme inactive complexé à divers facteurs cellulaires dont certaines protéines de choc thermique (hsp pour heat shock protein en anglais). La fixation d'un ligand agoniste (hormone stéroïde) entraîne un changement de la conformation du récepteur. Cette activation s'accompagne de la dissociation des facteurs cellulaires, d'une translocation nucléaire et augmente la capacité du récepteur à fixer une courte séquence d'ADN spécifique (séquence cible), ce qui permet l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle et l'induction de la transcription. Pour remplir leur fonction, ces récepteurs sont généralement organisés en 3 domaines fonctionnels, respectivement un domaine de trans-activation permettant l'activation de la transcription, un domaine de liaison à l'ADN (séquence cible) et un domaine de liaison au ligand (DLL).

Des récepteurs modifiés répondant préférentiellement à des ligands synthétiques non naturels sont également proposés dans la littérature. Par exemple, Wang et al. (1994, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 8180-8184) ont construit une chimère activable par la molécule RU486 mais pas par la progestérone endogène, qui résulte de la fusion du domaine de liaison au ligand du récepteur tronqué de la progestérone (APR), du domaine de liaison à l'ADN de la protéine de levure Gal4 et du domaine de trans-activation de la protéine VP16. Toutefois, l'activité basale reste élevée et la protéine chimère peut potentiellement interférer avec les facteurs transcriptionnels cellulaires. Des variants des récepteurs ER et GR modifiés dans

leurs domaines de liaison au ligand ont également été décrits. Ainsi, le mutant ER<sup>T</sup> obtenu par substitution de la glycine en position 521 du récepteur ER par une arginine, est incapable de fixer les oestrogènes endogènes, mais peut être activé par des ligands synthétiques tel que le Tamoxifen, pour activer la transcription régulée par la séquence cible ERE (pour estrogen responsive element). Un variant analogue a également été construit pour le récepteur GR, modifié en position 747 par substitution de l'isoleucine par une thréonine (Roux et al., 1996, *Molecular Endocrinology* 10, 1214-1226). Ce variant désigné GR<sup>dox</sup> est incapable de fixer les glucocorticoïdes endogènes, mais peut être activé par des ligands synthétiques tels que la Dexaméthasone. Une fois activé, il reconnaît la séquence cible GRE (pour glucocorticoïde responsive element ; Cato et al., 1986, *EMBO J.* 5, 2237-2240) et stimule la transcription du promoteur qui lui est associé.

Un autre système d'expression inductible utilise le récepteur stéroïdien d'insecte répondant à l'ecdysone (EcR). Le récepteur est activé par l'ecdysone et forme un hétérodimère avec la protéine ultraspiracle (USP) de la *Drosophile* qui se fixe à une séquence cible spécifique (EcRE pour ecdysone responsive element) pour activer la transcription. No et al. (1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3346-3351) ont créé un récepteur mutant VgEcR obtenu par fusion du DLL du récepteur EcR, d'un hybride entre le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs EcR et GR et du domaine de *trans*-activation de VP16. Le mutant peut former, en présence de l'ecdysone ou de son analogue muristone A, un hétérodimère avec la protéine USP ou son homologue humain, le récepteur de l'acide rétinoïque X (RXR), et activer la transcription de gènes placés sous le contrôle d'une séquence hybride (5xE/GRE) comprenant les motifs répondant aux récepteurs EcR et GR.

Un tel système évite une éventuelle activation endogène.

Un autre système d'expression inductible décrit dans la littérature met en oeuvre les immunophilines. Rivera et al. (1996, *Nat. Med.* 2, 1028-1032) ont développé un système à deux composantes assemblées en présence d'un ligand. Plus précisément, la première composante est une fusion entre le facteur de

transcription ZFHD1 (portant un domaine de liaison à l'ADN) et l'immunophiline FKBP12 et la deuxième composante est une fusion entre le domaine de trans-activation du facteur NF $\kappa$ B p65 et FRAP (FKBP12-rapamycine-associated protein). Le trans-activateur est activé sous forme d'un hétérodimère associant les  
5 deux composantes et la rapamycine liant les portions FKBP12 et FRAP qui peut induire l'expression d'un transgène placé sous le contrôle des éléments-cibles de ZFHD1.

Enfin, Dolwick et al. (1993, Mol. Pharmacol. 44, 911-917) ont identifié le récepteur aryl hydrocarbon (AhR) impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques  
10 et des substances chimiques élaborées par l'homme. L'AhR, sous forme inactive est complexé à divers facteurs cellulaires dont la protéine chaperonne hsp90. La fixation d'un ligand xénobiotique induit la dissociation du complexe, la translocation du AhR dans le noyau, la formation d'un hétérodimère avec la protéine Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ; Hoffman et al.,  
15 1991, Science 252, 954-958). La fixation de l'hétérodimère sur les éléments cibles de l'ADN nommés XRE (pour xenobiotique responsive elements) induit la transcription des séquences géniques en aval. La séquence XRE est présente dans la région promotrice de nombreux gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme de drogues, telles que glutathione-S-transférase ou cytochrome  
20 P4501A1. AhR et Arnt possèdent un domaine responsable de la reconnaissance de la séquence cible, de l'hétérodimérisation et de la liaison au ligand. La majorité des études de trans-activation par le biais du complexe AhR/Arnt utilise le ligand 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD)

La présente invention propose un système d'expression inducible mettant  
25 en oeuvre un vecteur adénoviral comportant un gène d'intérêt dont l'expression est régulée par un trans-activateur activable par l'apport de molécules pharmacologiques exogènes. Ce système est basé plus particulièrement sur l'utilisation d'un récepteur stéroïdien. Une fois activé, le complexe récepteur/ligand va se fixer sur sa séquence cible et permettre une activation *en trans* de

l'expression du gène thérapeutique. On a maintenant construit un vecteur adénoviral recombinant contenant, en remplacement de la région E1, une cassette d'expression du récepteur stéroïdien mutant GR<sup>dex</sup> exprimé de façon constitutive par le promoteur précoce du cytomégalo virus (CMV) et, en remplacement de la

5 région E3, une cassette d'expression du gène facteur IX (FIX) humain placé en aval du promoteur du virus MMTV (mouse mammary tumor virus) contenant la séquence cible GRE. Les expériences qui suivent montrent la fonctionnalité d'un tel système inductible *in vitro* et *in vivo*. De façon analogue, le récepteur ER<sup>T</sup> a également été inséré dans la région E1 d'un adénovirus sous le contrôle du

10 promoteur CMV. Dans ce cas, la cassette inductible du gène FIX est régulée par la séquence ERE associée au promoteur minimal du gène TK (thymidine kinase) de HSV (herpès simplex virus). Le troisième système étudié dans le cadre de la présente invention met en oeuvre le récepteur modifié VgEcR et le récepteur humain RXR dont les séquences ont été introduites dans la région E1 d'un

15 adénovirus. La cassette inductible présente dans la région E3 place l'ADNc du FIX sous le contrôle des éléments hybrides 5xE/GRE.

La finalité de la présente invention est de remédier aux inconvénients des vecteurs de thérapie génique actuels, en améliorant notamment la spécificité (activation par des substances exogènes non toxiques et non par des facteurs

20 cellulaires endogènes) et l'inductibilité (activité basale en l'absence d'inducteur minimale et forte expression du transgène à l'état activé). L'objet de la présente invention peut être appliqué à divers protocoles de thérapie génique nécessitant l'expression de molécules solubles, telles que des molécules antitumorales (anticorps, cytokines, chimiokines) ou dans tous les cas où l'expression du gène

25 thérapeutique devra être régulée en fonction des besoins de l'organisme. Il permet également l'analyse des gènes dont l'expression est cytotoxique ou réduite à certaines étapes du développement.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un système d'expression

inductible comprenant :

- 5 (i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel d'origine eucaryote ou virale et placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte, et
- (ii) un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

Aux fins de la présente invention, le terme «activateur transcriptionnel»

10 définit un polypeptide ou un ensemble de polypeptides exerçant une action positive sur la transcription c'est à dire ayant la capacité d'initier ou de stimuler la transcription d'un gène quelconque à partir d'éléments de régulation appropriés répondant audit activateur transcriptionnel. L'effet positif sur la transcription est de préférence médié directement par la liaison de l'activateur aux éléments de

15 régulation mais peut l'être indirectement par l'intermédiaire de facteur(s) cellulaire(s). De préférence, on a recours à un activateur transcriptionnel ligand-dépendant apte à lier une séquence d'ADN caractéristique (séquence cible) et à activer le promoteur qui lui est associé. De tels activateurs transcriptionnels sont décrits dans l'état de la technique. On indique également que dans le cadre de la

20 présente invention, l'activateur transcriptionnel peut être un polypeptide unique sous forme de monomère ou de multimère (de préférence dimère) ou encore peut résulter de l'association d'un ensemble de polypeptides formant un hétéromère (de préférence un ensemble de deux polypeptides formant un hétérodimère). L'activateur transcriptionnel en usage dans la présente invention peut être dérivé

25 d'un organisme quelconque d'origine eucaryote ou virale, notamment d'une levure, d'un insecte, d'un vertébré ou d'un virus ou peut avoir une origine mixte c'est à dire être formé de composantes d'origines diverses.

Un activateur transcriptionnel convenant à la mise en oeuvre de la présente invention comprend au moins 3 types de domaines fonctionnels, respectivement un

domaine de trans-activation, un domaine de liaison à l'ADN (séquence cible) et un domaine de liaison au ligand (DLL). Dans le cadre de la présente invention, l'ordre des différents domaines est sans importance. De plus, ils peuvent être répartis dans la séquence en acides aminés de manière continue ou discontinue (avec éventuellement un chevauchement des résidus impliqués dans chaque fonction) et localisés sur un ou les polypeptide(s) formant ledit activateur transcriptionnel. Par ailleurs, il peut comprendre plusieurs domaines d'un même type. Un exemple adéquate est constitué par l'hétérodimère développé par Rivera et al. (1996, Nat. Med. 2, 1028-1032) activé par la liaison de la rapamycine aux portions FKBP12 et FRAP.

Le terme «domaine de liaison au ligand» fait référence à la portion de l'activateur transcriptionnel qui interagit avec un ligand-inducteur approprié. L'interaction DLL-inducteur place l'activateur transcriptionnel en état activé, étape nécessaire à l'activation transcriptionnelle. Le DLL est de préférence localisé à l'extrémité C-terminale du ou d'un polypeptide composant ledit activateur transcriptionnel.

Le terme «domaine de liaison à l'ADN» fait référence à la portion de l'activateur transcriptionnel qui interagit avec la séquence d'ADN cible présente au sein du promoteur inductible contrôlant l'expression du gène d'intérêt et spécifique de l'activateur transcriptionnel choisi. Ladite séquence cible est généralement placée en amont d'une région promotrice contenant au moins une TATA box et est composée de motifs reconnus par l'activateur transcriptionnel. Ces motifs peuvent former une structure particulière (palindrome, répétitions en orientation sens ou inversée ...etc). Les séquences cibles adaptées à chaque activateur transcriptionnel sont décrites dans la littérature. Pour illustrer, on peut citer :

- la séquence cible GRE (pour glucocorticoïd responsive element) comportant un motif TGTTCT (ou son complémentaire) reconnu par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur GR ou d'un

analogue (GR<sup>dex</sup>). Un exemple préféré est constitué par la séquence 5'GGTACANNNTGTTCT3' où N représente un nucléotide quelconque ;

- 5        - la séquence cible ERE (pour oestrogen responsive element) comportant un motif 5'AGGTCA3' (ou son complémentaire) reconnu par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur ER ou d'un analogue (ER<sup>T</sup>). Un exemple préféré est constitué par la séquence 5'AGGTCANNNTGACC3' où N représente un nucléotide quelconque ;
- 10       - la séquence cible UAS (pour upstream activating sequence) de séquence 5' CGGAGTACTGTCCTCCG3' (ou son complémentaire) reconnue par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur Gal 4 de levure ou d'un analogue ;
- 15       - la séquence cible EcRE (pour ecdysone responsive element) comportant un motif GACAAG (ou son complémentaire) reconnu par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur EcR ou d'un analogue. Un exemple préféré est constitué par la séquence 5'GACAAGGGTTCAATGCACTTGTC3' ;
- 20       - la séquence 5xE/GRE de séquence 5'AGGTCANAGAACA3' (ou son complémentaire) reconnue par un domaine de liaison à l'ADN hybride entre EcR et GR ou d'un analogue,
- la séquence cible 5' TAATTANGGGNG3' où N représente un nucléotide quelconque, reconnue par le facteur de transcription ZFHD1
- 25       - la séquence cible XRE (pour xenobiotique responsive element) de séquence 5'CCTCCAGGCTTCTTCTCACGCAACTCC3' reconnue par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur AhR ou d'un analogue.

Le terme «domaine de trans-activation» fait référence à la portion de l'activateur transcriptionnel qui interagit avec la machinerie cellulaire pour initier ou stimuler la transcription génique dépendante de la séquence cible répondant audit activateur. Ce domaine peut être issu d'un facteur de transcription classique (NF $\kappa$ B, SP-1...) ou d'un facteur ligand-dépendant (récepteur stéroïdien, immunophiline, AhR...). Un domaine comprenant les 130 acides aminés C-terminaux de VP16 convient tout particulièrement.

La trans-activation induite par l'activateur transcriptionnel en usage dans le cadre de la présente invention peut être vérifiée simplement par des techniques conventionnelles, par exemple en suivant l'expression d'un gène donné placé sous le contrôle de la séquence cible adéquate ou la synthèse de son produit d'expression (analyse selon Northern, Western, immunofluorescence...etc) en présence du récepteur activé par l'inducteur. Un protocole détaillé est donné dans les exemples ci-après. Une différence d'un facteur d'au moins 2, avantageusement d'au moins 5 et, de préférence, d'au moins 10 reflète la capacité de trans-activation du système d'expression selon l'invention.

On peut illustrer ces définitions par l'exemple du récepteur GR. Son domaine de trans-activation est localisé dans la partie N-terminale entre les résidus 272 et 400 (Jonat et al., 1990, Cell 62, 1189-1204), le domaine de liaison à l'ADN de 66 acides aminés entre les résidus 421 et 487 (Lucibello et al., 1990, EMBO J. 9, 2827-2834) et le domaine de liaison au ligand hormonal d'environ 300 acides aminés dans la partie C-terminale (Kerpolla et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13, 3782-3791). Ce dernier domaine comprend également les séquences responsables pour la dimérisation du GR, sa localisation nucléaire et l'interaction avec les protéines hsp. La trans-activation est médiée par la liaison d'un dimère de récepteur à la séquence cible GRE.

Avantageusement, l'activateur transcriptionnel inclu dans le système d'expression inductible selon l'invention comporte tout ou partie d'un domaine dérivé d'un récepteur d'hormones stéroïdes choisi parmi le groupe constitué par

les récepteurs oestrogène (ER), glucocorticoïde (GR), progestérone (PR), Vitamine D, ecdysone (EcR), minéralocorticoïde, androgène, hormone thyroïde, acide rétinoïque et acide rétinoïque X ou encore d'une immunophiline ou d'un récepteur aryl hydrocarbon (AhR).

5 Dans le cadre de la présente invention, on peut mettre en oeuvre un récepteur modifié. Avantageusement, le récepteur modifié a perdu sa capacité d'activation par un inducteur naturel et acquis une capacité d'activation par un inducteur non naturel et retient la capacité de trans-activation du récepteur natif. L'homme de l'art connaît la ou les modifications à effectuer à cet égard. Elles  
10 peuvent être diverses (délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs résidus du récepteur naturel) et concerner un ou plusieurs domaines. De manière préférée, le domaine fonctionnel modifié présente une identité de séquence avec son équivalent natif d'au moins 70 %, avantageusement d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 % et, de manière tout à fait préférée d'au moins 95%.

15 Selon un premier mode de réalisation, on a recours à un récepteur modifié dans son DLL de manière à être activable par un inducteur non naturel. Des exemples préférés sont constitués par les mutants GR<sup>dex</sup> (I747T) et ER<sup>T</sup> (G521R) déjà cités.

On peut également envisager de mettre en oeuvre un activateur  
20 transcriptionnel chimère comprenant des polypeptides ou fragments polypeptidiques variés. Avantageusement, il résulte de la fusion ou de l'association de domaines fonctionnels d'origines différentes. En effet, il est possible d'échanger les domaines fonctionnels entre les différents récepteurs et toutes les combinaisons possibles entrent dans le cadre de la présente invention. Par exemple, pour réduire  
25 l'interférence avec les complexes récepteurs / ligands endogènes, on peut envisager de remplacer le domaine de liaison à l'ADN d'un récepteur stéroïdien par celui d'un récepteur non humain (d'origine virale ou animale ou d'eucaryote inférieur), par exemple un récepteur stéroïdien animal, un récepteur de levure (Gal4)... la

seule condition étant d'adapter la séquence cible au domaine de liaison à l'ADN retenu. Une telle adaptation est à la portée de l'homme de l'art. A titre indicatif, lorsque le domaine de liaison à l'ADN est issu de Gal4, le promoteur inductible mis en oeuvre contiendra les éléments UAS (Upstream Activating Sequences) 5 répondant à Gal4. Par ailleurs, le domaine de trans-activation peut être issu de n'importe quel domaine d'activation transcriptionnel connu, notamment de la protéine 16 du virus herpès simplex (VP16) ou de la p65 du facteur NFkB et en particulier, de son extrémité C-terminale. Un activateur transcriptionnel associant un DLL dérivé d'un récepteur stéroïdien, un domaine de trans-activation dérivé de 10 VP16 et un domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ou d'un récepteur stéroïdien convient à la mise en oeuvre de la présente invention. A cet égard, on utilisera de préférence les résidus 1 à 74 de Gal4. Mais d'autres combinaisons sont également envisageables.

Par ailleurs, on peut employer également un domaine fonctionnel hybride 15 entre des fragments polypeptidiques différents. Un exemple possible est constitué par un domaine de liaison à l'ADN hybride entre les récepteurs EcR et GR, reconnaissant une séquence cible hybride comportant les motifs répondant à l'ecdysone et aux glucocorticoïdes.

Un activateur transcriptionnel préféré dans le cadre de la présente invention 20 est choisi parmi :

- (i) un polypeptide désigné GR<sup>dex</sup> comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivés d'un récepteur aux glucocorticoïdes, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment par substitution de l'isoleucine en position 747 par une thréonine ;
- 25 (ii) un polypeptide désigné ER<sup>T</sup> comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivé d'un récepteur à l'oestrogène, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment par substitution de la glycine en position 521 par une arginine ;

- (iii) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un DLL dérivé du récepteur à l'ecdysone, un domaine de liaison à l'ADN hybride dérivé de ceux des récepteurs EcR et GR et un domaine de trans-activation dérivé de la protéine virale VP16 et un second polypeptide dérivé de la protéine USP de drosophile ou d'un homologue tel que le récepteur de l'acide rétinoïque X (RXR) humain ;
- (iv) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un domaine de liaison à l'ADN dérivé du facteur de transcription ZFHD1 et un DLL dérivé de l'immunophiline FKBP12 et un second polypeptide comportant un domaine de trans-activation dérivé du facteur NF $\kappa$ B p65 et un DLL dérivé de FRAP (FKBP12-rapamycine-associated protein) ; et
- (v) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide dérivé du récepteur AhR et un deuxième polypeptide dérivé de la protéine Arnt.
- De préférence, les activateurs transcriptionnels (i) et (ii) sont sous forme d'homodimères et (iii) (iv) et (v) sont sous forme d'hétérodimères associant le premier et le second polypeptide et, éventuellement, l'inducteur.

Selon un mode de réalisation tout à fait avantageux, l'activateur transcriptionnel est activé par liaison à un inducteur non naturel et n'est pas ou peu activé par un composé humain naturel.

Le terme «inducteur non naturel» se réfère à un composé qui n'est pas trouvé naturellement dans l'organisme humain ou animal à qui la thérapie utilisant le système d'expression inductible selon l'invention est destinée. Il s'agit de préférence d'un inducteur synthétique qui n'est pas trouvé naturellement dans un organisme humain et dont la structure est légèrement différente de celle d'un composé humain (endogène). Aux fins de la présente invention, un inducteur non naturel est capable d'activer l'activateur transcriptionnel en usage dans le cadre de la présente invention, en particulier par liaison au DLL, afin d'initier ou stimuler la transcription dépendante de la séquence cible répondant audit activateur. Le

choix d'un inducteur non naturel adapté à l'activateur transcriptionnel retenu est à la portée de l'homme de l'art sur la base de l'état de la technique. L'activation de l'activateur transcriptionnel par l'inducteur non naturel peut se faire par une interaction covalente ou non covalente (électrostatique, hydrophobe, liaison  
5 hydrogène ... etc). Par ailleurs, l'inducteur peut être constitué par un composé unique ou par un ensemble de molécules. Il appartient de préférence à la famille des stéroïdes, rétinoïdes, acides gras, vitamines, hormones, xénobiotiques ou antibiotiques.

Selon un mode de réalisation avantageux, ledit inducteur non naturel est  
10 une substance synthétique administrable par voie orale. De préférence, il est choisi parmi le groupe constitué par la dexaméthasone, le tamoxifène, le muristérone A, l'ecdysone, la rapamycine et le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) ou un analogue quelconque de ces composés, de préférence peu ou pas toxique.

Les séquences codant pour l'activateur transcriptionnel compris dans le  
15 système d'expression inductible selon l'invention sont placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés permettant l'expression dans une cellule ou un organisme hôte. Le terme «éléments de régulation appropriés» regroupent l'ensemble des éléments permettant la transcription desdites séquences en ARN et la traduction en protéine. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance  
20 particulière. Il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote, procaryote ou même virale. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène endogène. Par ailleurs, il peut être constitutif ou régulable. En outre, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription, rendre un promoteur constitutif régulable ou *vice*  
25 *versa*, introduire un site de restriction..... On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycérate Kinase), MT (metallothioneine ; Mc Ivor et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848), le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus), le LTR du RSV (Rous Sarcoma Virus), le promoteur TK-HSV-1, le promoteur précoce du virus CMV (Cytomegalovirus)

- et les promoteurs gouvernant l'expression des gènes adénoviraux tardifs (MLP) et précoces (E1A, E2A, E3 ou E4). Mais, il peut également être intéressant de réguler l'expression de l'activateur transcriptionnel. Selon une première variante, son expression peut être contrôlée par sa séquence cible spécifique (autoactivation et/ou activation par le récepteur sauvage endogène activé par le ligand endogène). Par exemple, on aura recours aux éléments ERE ou GRE pour l'expression d'un activateur transcriptionnel comportant un domaine de liaison à l'ADN dérivé de ER ou GR (ER<sup>T</sup> ou GR<sup>dx</sup>). Une autre possibilité est l'emploi d'un promoteur régulable choisi parmi ceux de l'art antérieur. A cet égard, l'utilisation d'un
- 10 promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse peut être avantageuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin. Invest. 96, 2775-2782), CEA (pour carcinoma embryonic antigen) surexprimé dans les cancers du colon (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748),
- 15 tyrosinase surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993, Cancer Res. 53, 3860-3864), ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175) et  $\alpha$ -fétoprotéine surexprimée dans les cancers du foie (Kanai et al., 1997, Cancer Res. 57, 461-465). On indique que le promoteur précoce du Cytomégalo virus (CMV) est tout particulièrement préféré.
- 20 Bien entendu, les éléments de régulation appropriés peuvent en outre comprendre des éléments additionnels améliorant l'expression (séquence intronique, séquence terminatrice de la transcription...) ou encore le maintien dans une cellule hôte. De tels éléments sont connus de l'homme de l'art.
- Lorsque l'activateur transcriptionnel en usage dans le cadre de la présente
- 25 invention est composé par un ensemble de polypeptides, ceux-ci peuvent être produits à partir de séquences nucléotidiques polycistroniques (placées sous le contrôle d'un promoteur unique) mettant en oeuvre un site d'initiation de la traduction de type IRES pour initier la traduction du second cistron. On peut également employer un promoteur bidirectionnel dirigeant l'expression de deux

gènes placés de part et d'autre. On peut aussi générer des cassettes d'expression indépendantes comportant chacune des éléments de régulation appropriés tels que ceux cités auparavant. Les cassettes peuvent être portées par un même vecteur d'expression ou par des vecteurs différents.

5 Les séquences employées dans le cadre de la présente invention peuvent être obtenues par les techniques classiques de biologie moléculaire, par exemple par criblage de banque à l'aide de sondes spécifiques, par immunocriblage de banque d'expression, par PCR au moyen d'amorces adéquates ou par synthèse chimique. Les mutants peuvent être générés à partir des séquences natives par  
10 substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides en mettant en oeuvre les techniques de mutagenèse dirigée, de PCR, de digestion par les enzymes de restriction et ligation ou encore par synthèse chimique. La fonctionnalité des mutants et des constructions peut être vérifiée par les techniques de l'art.

La deuxième composante du système d'expression inductible selon  
15 l'invention est un vecteur adénoviral recombinant comportant au moins un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

On aura de préférence recours à un vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie d'au moins une région essentielle à la réplication sélectionnée parmi les  
20 régions E1, E2, E4 et L1 à L5, afin d'éviter sa propagation au sein de l'organisme hôte ou de l'environnement. Une délétion de la majorité de la région E1 est préférée. Avantageusement, elle s'étend des nt 454 à 3328 mais peut également englober des séquences additionnelles en 5' et 3' à la condition de ne pas interférer avec la fonction d'encapsidation. De préférence, le gène pIX n'est pas inclus dans  
25 la délétion de E1. En outre, elle peut être combinée à d'autres modification(s) touchant notamment les régions E2, E4 et/ou L1-L5, dans la mesure où les fonctions essentielles déficientes sont complétées *en trans* au moyen d'une lignée de complémentation et/ou d'un virus auxiliaire. A cet égard, on peut avoir recours aux vecteurs de seconde génération défectifs pour les fonctions E1 et E4

ou E1 et E2 (voir par exemple les demandes internationales WO94/28152 et WO97/04119). Pour illustrer ce mode de réalisation, on peut citer un vecteur combinant une délétion au sein de la région E1 et une mutation thermosensible affectant le gène DBP (pour DNA Binding Protein en anglais) de la région E2A (Ensinger et al., 1972, *J. Virol.* *10*, 328-339). Pour ce qui est de la région E4, elle peut être délétée en totalité ou en partie. Une délétion partielle de la région E4 à l'exception des séquences codant pour les cadres de lecture ouverts (ORF) 3 et/ou 6/7 est avantageuse dans la mesure où elle ne nécessite pas de complémentation de la fonction E4 (Ketner et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* *17*, 3037-3048). Dans le but d'augmenter les capacités de clonage, le vecteur adénoviral recombinant peut en outre être dépourvu de tout ou partie de la région E3 non essentielle. Selon cette alternative, il peut être intéressant de conserver néanmoins les séquences E3 codant pour les polypeptides permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte, notamment la glycoprotéine gp19k (Gooding et al., 1990, *Critical Review of Immunology* *10*, 53-71). Selon une autre alternative, on peut employer un vecteur adénoviral minimal retenant essentiellement les ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' et 3' et la région d'encapsidation et défectif pour l'ensemble des fonctions virales.

Par ailleurs, l'origine du vecteur adénoviral du système d'expression inductible selon l'invention, peut être variée aussi bien du point de vue de l'espèce que du sérotype. Il peut dériver du génome d'un adénovirus humain ou animal (canin, aviaire, bovin, murin, ovin, porcin, simien...) ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral d'au moins deux origines différentes. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., *Arch. Virol.*, 1993, *128*: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, *J. Gen. Virol.*, 1989, *70*: 165-172 ; Jouvenne et al., *Gene*, 1987, *60*: 21-28 ; Mittal et al., *J. Gen. Virol.*, 1995, *76*: 93-102). Cependant, on préférera un vecteur adénoviral d'origine humaine dérivant de préférence d'un adénovirus de sérotype C,

notamment de type 2 ou 5.

Le gène d'intérêt en usage dans la présente invention, peut être issu d'un organisme eucaryote, d'un procaryote d'un parasite ou d'un virus autre qu'un adénovirus. Il peut être isolé par toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art, par exemple par clonage, PCR ou synthèse chimique. Il peut être de type génomique (comportant tout ou partie de l'ensemble des introns), de type ADN complémentaire (ADNc, dépourvu d'intron) ou de type mixte (minigène). Par ailleurs, il peut coder pour un ARN antisens et/ou un ARN messenger (ARNm) qui sera ensuite traduit en polypeptide d'intérêt celui-ci pouvant être (i) intracellulaire, (ii) incorporé dans la membrane de la cellule hôte ou (iii) sécrété. Il peut s'agir d'un polypeptide tel que trouvé dans la nature (natif), d'une portion de celui-ci (tronqué), d'un mutant présentant notamment des propriétés biologiques améliorées ou modifiées ou encore d'un polypeptide chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses. Par ailleurs, le gène d'intérêt peut coder pour un ARN anti-sens, un ribozyme, ou encore un polypeptide d'intérêt.

Parmi les polypeptides d'intérêt utilisables, on peut citer plus particulièrement les chémokines et cytokines (interféron  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ , interleukine (IL), notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou encore l'IL-12, facteur nécrosant des tumeurs (TNF), facteur stimulateur de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, protéine de chémoattraction des monocytes telle que MCP-1...), les récepteurs cellulaires (notamment reconnus par le virus HIV), les ligands de récepteur, les facteurs de coagulation (Facteur VIII, Facteur IX, thrombine, protéine C), les facteurs de croissance (FGF pour Fibroblast Growth Factor, VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor), les enzymes (uréase, rénine, métalloprotéinase, nitric oxide synthétase NOS, SOD, catalase, lécithine cholestérol acyl transférase LCAT...), les inhibiteurs d'enzyme ( $\alpha$ 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteur de protéase virale, PAI-1 pour plasminogen activator inhibitor), les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II

- ou polypeptides agissant sur l'expression des gènes correspondants, les polypeptides capables d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement, les polypeptides agissant positivement ou négativement sur l'apoptose (Bax, Bcl2, BclX...), les agents cytostatiques (p21, p 16, Rb), les immunoglobulines en totalité ou en partie (Fab, ScFv...), les toxines, les immunotoxines, les apolipoprotéines (ApoAI, ApoAIV, ApoE...), les inhibiteurs d'angiogénèse (angiostatine, endostatine...), les marqueurs ( $\beta$ -galactosidase, luciférase...) ou tout autre polypeptide ayant un effet thérapeutique pour l'affection ciblée.
- 10 Plus précisément, dans le but de traiter un dysfonctionnement héréditaire, on utilisera une copie fonctionnelle du gène défectueux, par exemple un gène codant pour le facteur VIII ou IX dans le cadre de l'hémophilie A ou B, la dystrophine (ou minidystrophine) dans le cadre des myopathies de Duchenne et Becker, l'insuline dans le cadre du diabète, la protéine CFTR (Cystic Fibrosis
- 15 Transmembrane Conductance Regulator) dans le cadre de la mucoviscidose. S'agissant d'inhiber l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers, on mettra de préférence en oeuvre un gène d'intérêt codant pour un ARN anti-sens, un ribozyme, un produit cytotoxique (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique, produit des gènes de levure
- 20 *FCYI* et *FURI* codant pour l'uracyle phosphoribosyl transférase et la cytosine désaminase.....), une immunoglobuline, un inhibiteur de la division cellulaire ou des signaux de transduction, un produit d'expression d'un gène suppresseur de tumeur (p53, Rb, p73, DCC....), un polypeptide stimulateur du système immunitaire, un antigène associé à une tumeur (MUC-1, BRCA-1, antigènes précoces ou tardifs
- 25 (E6, E7, L1, L2...) d'un virus à papillome HPV....), éventuellement en combinaison avec un gène de cytokine. Enfin, dans le cadre d'une thérapie anti-HIV, on peut avoir recours à un gène codant pour un polypeptide immunoprotecteur, un épitope antigénique, un anticorps (2F5; Buchacher et al., 1992, Vaccines 92, 191-195), le domaine extracellulaire du récepteur CD4 (sCD4 ; Trauneker et al., 1988, Nature

331, 84-86) une immunoadhésine (par exemple un hybride CD4-immunoglobuline IgG ; Capon et al., 1989, Nature 337, 525-531 ; Byrn et al., 1990, Nature 344, 667-670), une immunotoxine (par exemple fusion de l'anticorps 2F5 ou de l'immunoadhésine CD4-2F5 à l'angiogénine ; Kurachi et al., 1985, Biochemistry 24, 5494-5499), un variant trans-dominant (EP 0614980, WO95/16780), un produit cytotoxique tel que l'un de ceux mentionné ci-dessus ou encore un IFN $\alpha$  ou  $\beta$ .

Un des gènes d'intérêt peut également être un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées ou transduites. On peut citer les gènes *neo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transférase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transférase). D'une manière générale, les gènes de sélection sont connus de l'homme de l'art.

Par ailleurs, la cassette d'expression du gène d'intérêt peut, en outre, inclure des éléments additionnels améliorant son expression ou son maintien dans la cellule hôte (origines de répllication , éléments d'intégration dans le génome cellulaire, séquences introniques, séquences poly A de terminaison de la transcription, leaders tripartites...). Ces éléments sont connus de l'homme de l'art. En outre, le gène d'intérêt peut également comporter en amont de la région codante une séquence codant pour un peptide signal permettant sa sécrétion de la cellule hôte. Le peptide signal peut être celui du gène en question ou hétérologue (issu d'un gène quelconque sécrété ou synthétique).

La cassette d'expression du gène d'intérêt peut être insérée à un endroit quelconque du génome adénoviral. Avantageusement, elle est introduite en remplacement de la région E3. Lorsque le vecteur adénoviral recombinant comporte plusieurs gènes d'intérêt, ceux-ci peuvent être placés sous le contrôle des mêmes éléments génétiques (cassette polycistronique utilisant un site interne d'initiation de la traduction de type IRES pour réinitier la traduction du second cistron) ou d'éléments indépendants. Dans ce cas, ils peuvent être insérés dans une

même région adénovirale (par exemple en remplacement de E3) ou dans des régions différentes (par exemple en remplacement de E3 et d'une autre région délétée).

Dans le cadre de la présente invention, l'expression du gène d'intérêt est

5 contrôlée par un promoteur inductible par un activateur transcriptionnel tel que défini ci-avant. Au sens de la présente invention, un promoteur inductible comprend au moins une séquence cible répondant à l'activateur transcriptionnel mis en oeuvre et associée de manière opérationnelle à un promoteur minimal. Les séquences cibles ont été définies auparavant et sont décrites dans la littérature

10 accessible à l'homme de l'art (pour rappel, ERE, GRE, EcRE, UAS, 5xE/GRE, XRE...). On indique que l'on peut employer une séquence homologue modifiée par rapport à la séquence native mais exerçant une fonction de régulation similaire ou améliorée. Ces modifications peuvent résulter de l'addition, de la délétion et/ou de la substitution d'un ou plusieurs nucléotides ou de fusion entre deux séquences

15 cibles différentes. On peut mettre en oeuvre une ou plusieurs séquences cibles, par exemple de 1 à 25, avantageusement de 1 à 10 et, de préférence, de 1 à 7, éventuellement placées en tandem et dans une orientation quelconque par rapport à la TATA box. Elle(s) est (sont) généralement insérée(s) dans le promoteur inductible en amont du promoteur minimal, jusqu'à plusieurs centaines de paires

20 de bases de celui-ci. Un exemple de promoteur inductible par un activateur transcriptionnel dérivé du GR, est le LTR du virus MMTV (mouse mammary tumor virus) qui contient l'élément GRE et des séquences promotrices adéquates.

Un promoteur minimal comprend essentiellement une TATA box et un site d'initiation de la transcription fonctionnels dans une cellule ou un organisme hôte.

25 Ces éléments sont classiques dans le domaine de l'art concerné. On peut citer plus particulièrement les promoteurs minimaux des gènes TK, CMV et HSP (promoteur minimal du gène de protéine de choc thermique de drosophile dépourvu de l'enhancer).

En outre, le promoteur inductible en usage dans le cadre de la présente

invention peut comporter des éléments supplémentaires améliorant le niveau de transcription ou le limitant à certains tissus particuliers (de type enhancer). Ces éléments supplémentaires peuvent de manière alternative être insérés dans une région génique non codante.

5            Selon un premier mode de réalisation, les séquences nucléotidiques codant pour l'activateur transcriptionnel et leurs éléments de régulation sont portées par le vecteur adénoviral recombinant du système d'expression selon l'invention. Les cassettes d'expression du gène d'intérêt et de l'activateur transcriptionnel peuvent être localisées dans la même région du génome adénoviral ou en des endroits  
10 différents et en orientation sens ou anti-sens l'une par rapport à l'autre. L'orientation anti-sens est préférée. Un exemple préféré est fourni par un vecteur E1<sup>-</sup> E3<sup>-</sup> dans lequel chacune des cassettes est insérée à la place des séquences adénovirales déléetées.

            Selon une autre variante, les séquences nucléotidiques sont portées par un  
15 vecteur d'expression indépendant autre que le vecteur adénoviral recombinant en usage dans le système d'expression selon l'invention. Il peut s'agir d'un vecteur synthétique (lipides cationiques, liposomes polymères ...), d'un plasmide ou encore d'un vecteur viral. Il peut être éventuellement associé à une ou plusieurs substances améliorant l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité du vecteur. Ces substances  
20 sont largement documentées dans la littérature accessible à l'homme de l'art (voir par exemple Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman, 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342 ; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). A titre illustratif mais non limitatif, il peut s'agir de polymères, de lipides notamment cationiques, de liposomes, de  
25 protéines nucléaires ou encore de lipides neutres. Ces substances peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Une combinaison envisageable est un vecteur recombinant plasmidique associé à des lipides cationiques (DOGS, DC-CHOL, spermine-chol, spermidine-chol etc...) et des lipides neutres (DOPE).

            Le choix des plasmides utilisables dans le cadre de la présente invention est

vaste. Il peut s'agir de vecteurs de clonage et/ou d'expression. D'une manière générale, ils sont connus de l'homme de l'art et nombre d'entre eux sont disponibles commercialement mais il est également possible de les construire ou les modifier par les techniques de manipulation génétique. On peut citer à titre

5 d'exemples les plasmides dérivés de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagène), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) ou encore p Poly (Lathe et al., 1987, *Gene* 57, 193-201). De préférence, un plasmide mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention contient une origine de replication assurant l'initiation de la replication dans une cellule productrice et/ou une cellule hôte (par

10 exemple, on retiendra l'origine ColE1 pour un plasmide destiné à être produit dans *E. coli* et le système oriP/EBNA1 si l'on désire qu'il soit autoreplicatif dans une cellule hôte mammifère, Lupton et Levine, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5, 2533-2542 ; Yates et al., *Nature* 313, 812-815). Il peut en outre comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées

15 (complémentation d'une mutation d'auxotrophie, gène codant pour la résistance à un antibiotique...). Bien entendu, il peut comprendre des éléments supplémentaires améliorant son maintien et/ou sa stabilité dans une cellule donnée (séquence *cer* qui favorise le maintien monomérique d'un plasmide (Summers et Sherrat, 1984, *Cell* 36, 1097-1103, séquences d'intégration dans le génome cellulaire).

20 S'agissant d'un vecteur viral, on peut envisager un vecteur dérivant d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus associé à l'adénovirus (AAV), d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus, d'un parvovirus, d'un poxvirus (fowlpox, canaripox, virus de la vaccine notamment de la souche MVA (Modified Virus Ankara) ou Copenhagen... etc) ou d'un foamyvirus. On aura de préférence recours à un

25 vecteur non réplcatif et, éventuellement, non intégratif.

Les rétrovirus ont la propriété d'infecter et de s'intégrer majoritairement dans les cellules en division et à cet égard sont particulièrement appropriés pour l'application cancer. Un vecteur rétroviral convenant à la mise en oeuvre de la présente invention comporte les séquences terminales LTR, une région

d'encapsulation et les séquences nucléotidiques codant pour l'activateur transcriptionnel dont l'expression est contrôlée par le promoteur rétroviral (dans le LTR 5') ou par un promoteur interne tel que cité ci-dessus. Il peut dériver d'un rétrovirus d'une origine quelconque (murin, primate, félin, humain etc...) et en particulier du MoMuLV (Moloney murine leukemia virus), MVS (Murine sarcoma virus) ou Friend murine retrovirus (Fb29). Il est propagé dans une lignée d'encapsulation capable de fournir *en trans* les polypeptides viraux gag, pol et/ou env nécessaires à la constitution d'une particule virale. De telles lignées sont décrites dans la littérature (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc...). Le vecteur rétroviral selon l'invention peut comporter des modifications notamment au niveau des LTRs (remplacement de la région promotrice par un promoteur eucaryote) ou de la région d'encapsulation (remplacement par une région d'encapsulation hétérologue, par exemple de type VL30) (voir les demandes françaises 94 08300 et 97 05203).

Un vecteur adénoviral convient tout particulièrement pour l'expression de l'activateur transcriptionnel envisagé dans le cadre de la présente invention. On aura de préférence recours à un vecteur déficient ayant l'une des caractéristiques précitées. En particulier, les vecteurs adénoviraux recombinant (portant la cassette d'expression inducible du gène d'intérêt) et indépendant (portant la cassette d'expression de l'activateur transcriptionnel) sont de préférence tous deux déficients pour la fonction E1 par délétion de tout ou partie de la région E1 ou mutation non fonctionnelle. Le cas échéant, l'un ou l'autre ou les deux peuvent être en outre déficient(s) pour au moins l'une des fonctions E2, E4, L1, L2, L3, L4 et/ou L5. De même, une délétion de tout ou partie de la région E3 peut être envisagée pour l'un ou les deux vecteurs.

Selon un mode de réalisation avantageux, les vecteurs viraux (vecteur adénoviral recombinant et, le cas échéant, ledit vecteur viral indépendant) faisant partie du système d'expression selon l'invention peuvent être sous la forme de vecteur ADN ou de particule virale infectieuse.

La présente invention concerne également un vecteur adénoviral recombinant comprenant

- 5 (i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte, et
- (ii) un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

Le vecteur adénoviral recombinant selon l'invention peut coder pour un activateur transcriptionnel ayant les caractéristiques définies auparavant qui, sous  
10 forme activé par un inducteur tel que décrit précédemment, a la capacité d'initier ou d'activer la transcription d'un gène contrôlé par un promoteur inductible comprenant une séquence cible spécifique dudit activateur transcriptionnel telle que décrite ci-dessus.

De manière alternative, le vecteur adénoviral recombinant selon l'invention  
15 peut coder pour un activateur transcriptionnel procaryotique et, notamment, un polypeptide comprenant un DLL et un domaine de liaison à l'ADN dérivé d'un répresseur de l'opéron tétracycline (tetR) et un domaine d'activation de la transcription quelconque. Il s'agit de préférence du polypeptide désigné dans la littérature «trans-activateur tétracycline» tTA (Gossen et Bujard, 1992, Proc. Natl.  
20 Acad. Sci. USA 89, 5547-551) dans lequel le tetR isolé du transposon Tn10 est fusionné en phase aux 130 acides aminés C-terminaux de la protéine virale VP16. Dans ce cas, on mettra en oeuvre un inducteur non naturel activant le tTA, tel que la doxycycline, la tétracycline ou un analogue agoniste. Bien entendu, les caractéristiques de la cassette d'expression inductible du gène d'intérêt sont les  
25 mêmes que précédemment, mis à part la présence d'une ou plusieurs séquence(s) cible(s) répondant à l'activateur transcriptionnel procaryotique. S'agissant de tTA, la séquence cible est constituée par l'opérateur tétracycline (tetO). Dans le cadre de la présente invention, on préfère tout particulièrement la combinaison "tet O - promoteur minimal" donnant lieu à un promoteur dont le niveau de base de la

transcription est naturellement très faible mais activable par l'inducteur tTA et répressible par la tétracycline.

Il n'est pas nécessaire de revenir sur le squelette du vecteur adénoviral recombinant selon l'invention dans la mesure où il répond aux caractéristiques déjà  
5 mentionnées.

La présente invention concerne également une particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention.

Les techniques de préparation des vecteurs adénoviraux sont largement documentées dans la littérature. Dans un premier temps, le génome est reconstitué  
10 par recombinaison homologue dans la lignée 293 (voir notamment Graham et Preveet, 1991, Methods in Molecular Biology, Vol 7, Gene Transfer and Expression Protocols ; Ed E. J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ) ou dans *Escherichia coli* (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810 ; WO96/17070). Il est ensuite nécessaire de propager le vecteur afin de constituer  
15 un stock de particules virales le contenant. On utilise à cet effet des lignées de complémentation fournissant *en trans* les produits d'expression viraux pour lesquels le vecteur est defectif. Par exemple, les virus délétés de E1 peuvent être propagés dans la lignée 293, établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). Pour ce qui est des  
20 vecteurs de seconde génération, on peut avoir recours à des lignées complémentant deux fonctions virales essentielles, telles que celles décrites par Yeh et al. (1996, J. Virol. 70, 559-565), Krougliak et Graham (1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586), Wang et al. (1995 Gene Therapy 2, 775-783), Lusky et al. (1998, J. Virol. 72, 2022-2033) et dans les demandes internationales WO94/28152 et  
25 WO97/04119. Une autre alternative repose sur l'emploi d'un élément viral supplémentaire, désigné "virus auxiliaire" pour compléter au moins en partie les fonctions défectives d'un vecteur adénoviral recombinant. Les virus auxiliaires de l'art antérieur consistent en un génome adénoviral, éventuellement délété d'une région essentielle pour laquelle le vecteur recombinant ne nécessite pas de

complémentation.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule virale, selon lequel :

- 5 (i) on introduit un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule de complémentation transfectée,
- (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite  
10 particule virale, et
- (iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

Bien entendu, la particule virale peut être récupérée du surnageant de culture mais également des cellules. Une des méthodes couramment employée consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation  
15 pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un gradient de chlorure de césium...).

La présente invention concerne également une cellule eucaryote comprenant un système d'expression inductible, un vecteur adénoviral recombinant  
20 selon l'invention ou infectée par une particule virale selon l'invention. Aux fins de la présente invention, une telle cellule est constituée par toute cellule transfectable par un vecteur ou infectable par une particule virale, tels que définis ci-avant. Une cellule de mammifère et notamment humaine convient tout particulièrement. Il peut s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine quelconque, notamment  
25 hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage...), musculaire (cellule satellite, myocyte, myoblaste, muscle lisse...), cardiaque, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique un système d'expression inductible, un vecteur adénoviral

recombinant, une particule virale ou une cellule hôte selon l'invention en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Une composition selon l'invention est plus particulièrement destinée au traitement préventif ou curatif de maladies par thérapie génique (y compris immunothérapie) et s'adresse plus particulièrement aux maladies prolifératives (cancers, tumeurs, dysplasies...etc), aux maladies infectieuses et notamment virales (induites par les virus de l'hépatite B ou C, le HIV, l'herpès, les rétrovirus....etc), aux maladies génétiques (mucoviscidose, myopathies, hémophilie, diabète...) et aux maladies cardiovasculaires (resténose, ischémie, dislipidémie...).

10 Une composition selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle en vue d'une administration par voie locale, parentérale ou digestive. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Les voies d'administration envisageables sont multiples. On peut  
15 citer par exemple la voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intraartérielle, intrapéritonéale, intratumorale, intranasale, intrapulmonaire ou intratrachéale. Pour ces trois derniers modes de réalisation, une administration par aérosol ou instillation est avantageuse. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois  
20 après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et les doses de virus appropriées varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu, de la pathologie, du gène d'intérêt à transférer, de la voie d'administration. À titre indicatif, les préparations à base de particules virales peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  ufp (unités formant des plages),  
25 avantageusement  $10^5$  et  $10^{13}$  ufp et, de préférence,  $10^6$  et  $10^{12}$  ufp. Lorsque l'on met en oeuvre un ou des vecteur(s), des doses comprenant de 0,01 à 100 mg d'ADN, de préférence 0,05 à 10 mg et, de manière tout à fait préférée, 0,5 à 5 mg peuvent être envisagées.

La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même que des agents de solubilisation, de stabilisation, de préservation. Une composition préférée est sous forme injectable. Elle peut être formulée en solution aqueuse, saline (phosphate, monosodique, disodique, magnésium, potassium....) ou isotonique. Elle peut être présentée en dose unique ou en multidose sous forme liquide ou sèche (poudre, lyophilisat...) susceptible d'être reconstituée de manière extemporanée par un diluant approprié.

La présente invention est également relative à l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un système d'expression inductible, d'un vecteur adénoviral recombinant, d'une particule virale ou d'une cellule hôte selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au transfert et à l'expression dudit gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte et, en particulier, au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol, dans le système vasculaire au moyen d'une sonde appropriée...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient après une étape d'amplification éventuelle. La prévention et le traitement de nombreuses pathologies peuvent être envisagés. Une utilisation préférée consiste à traiter ou prévenir les cancers, tumeurs et maladies résultant d'une prolifération cellulaire non désirée. Parmi les applications envisageables, on peut citer les cancers du sein, de l'utérus (notamment ceux induits par les papillomas virus), de la prostate, du poumon, de la vessie, du foie, du colon, du pancréas, de l'estomac, de l'oesophage, du larynx du système nerveux central et du sang (lymphomes, leucémie etc...). Elle est également utile dans le cadre des maladies cardiovasculaires, par exemple pour inhiber ou retarder la

prolifération des cellules de muscles lisses de la paroi vasculaire (resténose). Enfin pour ce qui est des maladies infectieuses, l'application au SIDA peut être envisagée.

L'invention s'étend également à une méthode pour le traitement des  
5 maladies par thérapie génique, caractérisée en ce que l'on administre à un organisme ou à une cellule hôte ayant besoin d'un tel traitement un système d'expression inductible, un vecteur adénoviral recombinant, une particule virale ou une cellule hôte selon l'invention.

Enfin, l'invention concerne également un activateur transcriptionnel  
10 comprenant un DLL et un domaine de trans-activation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, notamment dérivé de la protéine de levure Gal4. Un tel activateur transcriptionnel est obtenu en échangeant par les techniques de biologie moléculaire le domaine de liaison à l'ADN du récepteur stéroïdien par celui de Gal4 (en particulier porté par les résidus 1 à 74).  
15 Un hybride ER<sup>T</sup> ou GR<sup>dex</sup> et Gal4 est tout à fait préféré.

On indique que l'ensemble des dénominations utilisées dans la présente demande sont conventionnelles dans le domaine de l'art et que la portée inclut aussi les équivalents fonctionnels, c'est à dire tout polypeptide, domaine, gène, composé obtenu par modification d'un polypeptide, domaine, gène, composé natif  
20 et présentant une activité de même nature, voire sensiblement augmentée.

La Figure 1 est une représentation schématique de la quantité de FIX produite 144 h après transfection transitoire des cellules 293 par les plasmides pTG13064 (CMV-GR<sup>dex</sup>), pTG6242 (LTR MMTV-FIX, sens) et pTG13063 (LTR  
25 MMTV-FIX, anti-sens).

La Figure 2 : Evaluation de l'effet Dose / Réponse Dexaméthasone dans des cellules A549. L'infection des cellules est réalisée avec une MOI = 50 avec AdTG13092 ou AdTG13088. L'induction par la dexaméthasone est réalisée en

faisant varier la concentration de  $10^{-9}$  à  $10^{-7}$ M.

La Figure 3 : Représentation schématique des constructions AdTG13075, AdTG13088, AdTG13092 et AdTG13245.

La Figure 4 (a, b, c et d) : Evaluation *in vivo* du système inductible Grdex / Dexaméthasone avec les différentes constructions testées dans les souris C57B1/6. Les valeurs présentées sont les moyennes des valeurs mesurées dans chacune des souris traitées.

La Figure 5 (a, b, c et d) : Evaluation *in vivo* du système inductible Grdex / Dexaméthasone avec les différentes constructions testées dans les souris SCID. Les valeurs présentées sont les moyennes des valeurs mesurées dans chacune des souris traitées.

La Figure 6 : Evaluation d'un effet Dose / Réponse Dexaméthasone *in vivo* dans des souris SCID.

La Figure 7 : Représentation schématique de vecteurs adénoviraux dérivant du plasmide pTg6401 de première et de deuxième générations.

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples suivants.

### EXEMPLES

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ou une édition plus récente) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de clonage sont réalisées dans les souches *E. coli* 5K (hsdR, mcrA), DH5 $\alpha$  [(recA1, endA1, hodR17 (r-m-), supE44 thi-1, gyrA (nalr)] ou NM522 (supE, thi,  $\Delta$ (lac-proAB),  $\Delta$ hsd5, (r-m-), (F' proAB, lacI<sup>q</sup>, ZAM15) et celles de recombinaison homologue dans la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la

réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow, Boehringer Mannheim). Les fragments d'ADN sont purifiés à l'aide du kit de purification d'ADN GeneCleanII<sup>R</sup> (Bio101Inc.). Par  
5 ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, on a recours aux lignées  
10 cellulaires 293 (Graham et al, 1977, *supra* ; disponible à l'ATCC sous la référence CRL1573), A549 E1+ (WO94/28152), A549 (ATCC CCL-185) et Vero (ATCC CCL-81). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL)  
15 complémenté avec 1 mM de glutamine, 1% d'acides aminés (Gibco BRL), 40µg/l de gentamycine et 10% de sérum de veau foétal (SVF, Gibco BRL). La transfection et la transduction des cellules est réalisée selon les techniques de l'art (précipitation au phosphate de calcium...)

20 **EXEMPLE 1 : Construction d'un vecteur adénoviral co-exprimant l'activateur transcriptionnel ER<sup>T</sup> et le gène FIX régulé par les séquences ERE.**

L'ADNc du gène sauvage ER est contenu dans le plasmide pSG1-HEO  
25 (Tora et al., 1989, EMBO J. 8, 1981-1989). Le domaine de liaison aux oestrogènes du récepteur ER (fragment *Bam*HI-*Xba*I) est remplacé par celui du mutant ER<sup>T</sup> (G521R) porté par le fragment *Not*I-*Xba*I de pCre-ER<sup>T</sup> (Feil et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10887-10890). Les séquences ER<sup>T</sup> sont insérées dans le

site *EcoRI* du vecteur de transfert pTG6600. A titre indicatif, pTG6600 est un vecteur p polyII (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) dans lequel sont insérées les séquences Ad5 1 à 458, le promoteur précoce CMV, les séquences d'épissage hybrides trouvées dans le plasmide pCI (Promega Corp, comprenant le site 5 donneur d'épissage de l'intron 1 du gène  $\beta$ -globine humaine et le site accepteur d'épissage du gène d'immunoglobuline de souris), les séquences de polyadénylation du virus SV40 et les séquences Ad5 3328-5788. Une telle construction est à la portée de l'homme de l'art. Le vecteur ainsi obtenu pTG6237 contient la cassette d'expression CMV-ER<sup>T</sup> présente dans la région E1. La 10 construction finale désignée pTG6246 est reconstituée par recombinaison homologue (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810) entre le fragment *PacI*-*Bst* EII isolé du vecteur précédent et pTG4656 linéarisé par *ClaI*. Ce dernier est un plasmide adénoviral E1<sup>+</sup> E3<sup>-</sup> contenant dans E1 le gène LacZ sous le contrôle du promoteur MLP (décrit dans la demande FR97 06757). Ainsi le génome 15 adénoviral porté par pTG6246 comprend la cassette CMV-ER<sup>T</sup> dans la région E1 et est délété de la région E3.

L'ADNc du FIX humain (Anson et al, 1984, EMBO J. 3, 1053-1060) est cloné sous forme d'un fragment *Bam*HI isolé d'un plasmide de l'art antérieur (par exemple décrit dans le brevet 88 14635) et inséré en aval du promoteur minimal 20 TK-HSV précédé de la séquence ERE (Klein-Hitpass et al., 1986, Cell 46,1053-1061). La cassette est introduite dans le site *Bgl*II de pTG4664 en orientation sens et antisens (donnant respectivement pTG13227 et pTG13228). Le plasmide pTG4664 comprend les nucléotides 25838 à 320004 de l'Ad5 délétés des nucléotides 27871 à 30748 de la région E3. Une recombinaison homologue avec 25 le plasmide pTG6401 digéré par *Sfi*I (comportant le génome Ad5 délété des régions E1 et E3) permet de générer les vecteurs adénoviraux E1<sup>+</sup> E3<sup>-</sup> portant la cassette inductible ERE/TKp-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3. La construction sens (correspondant au sens de transcription de E3) est dénommée

pTG13235 et la construction anti-sens pTG13236.

Les vecteurs doublement recombinants contenant les cassettes d'expression CMV-ER<sup>T</sup> et ERE/TKp-FIX à la place des régions E1 et E3 respectivement sont générés par recombinaison homologue entre les fragments portant la cassette  
5 inductible FIX isolés des vecteurs pTG13227 et pTG13228 et le vecteur pTG6246. On obtient pTG13233 et pTG13234 selon l'orientation de la cassette inductible.

**EXEMPLE 2 : Construction d'un vecteur adénoviral co-exprimant  
l'activateur transcriptionnel GR<sup>dex</sup> et le gène FIX régulé par  
10 les séquences GRE.**

L'ADNc du récepteur GR<sup>dex</sup> porté par le fragment *EcoRI* (2,7Kb) du plasmide pHG1 (Kumar et al., 1987, Cell 51, 941-951) est cloné dans le site *EcoRI* du vecteur pTG6600, pour donner pTG13064. Le vecteur adénoviral pTG13075  
15 contenant la cassette d'expression CMVp-GR<sup>dex</sup> en remplacement de la région E1 et délété de la majorité de la région E3 est obtenu par recombinaison homologue entre le fragment *PacI-Bst* EII isolé du vecteur précédent et pTG4656 linéarisé par *ClaI*.

Le fragment *Bam*HI contenant l'ADNc du FIX humain est inséré en aval  
20 du LTR de MMTV contenant la séquence GRE (Cato et al., 1986, EMBO J. 5, 2237-2240). La cassette est ensuite introduite en orientation sens et antisens dans le site *Bgl*II de pTG4664 bordant les séquences E3 déléetées. Les vecteurs de transfert sont désignés pTG6242 (sens) et pTG13063 (anti-sens). Une recombinaison homologue avec le plasmide pTG6401 digéré par *Sfi*I (comportant  
25 le génome adénoviral délété des régions E1 et E3) permet de générer les vecteurs adénoviraux E1<sup>-</sup> E3<sup>-</sup> portant la cassette inductible LTR MMTV-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3. La construction sens (identique au sens de transcription de E3) est dénommée pTG13082 et la construction anti-sens

pTG13088.

Une recombinaison homologue avec le plasmide pTG13075 permet de générer les vecteurs adénoviraux E1<sup>+</sup> E3<sup>-</sup> portant la cassette inductible LTR MMTV-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3 et la cassette CMV-GR<sup>dex</sup> dans la région E1. La construction sens (identique au sens de transcription de E3) est dénommée pTG13083 et la construction anti-sens pTG13092 (sens de transcription inverse pour les cassettes FIX et GR<sup>dex</sup>).

**EXEMPLE 3 : Construction d'un vecteur adénoviral co-exprimant l'activateur transcriptionnel VgEcR et le gène FIX régulé par les séquences 5xE/GRE.**

Le plasmide pVgRXR (In Vitrogen) comprend les deux sous-unités composant l'activateur transcriptionnel activable par l'ecdysone ou son analogue muristérone A. La première est composée du récepteur de l'ecdysone (VgEcR) modifié au niveau de trois acides aminés du domaine de liaison à l'ADN de façon à obtenir une séquence analogue à celle du récepteur GR et fusionné en phase au domaine de trans-activation de VP16 et la seconde du récepteur de l'acide rétinoïque humain RXR (No et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3346-3351). Les deux ADNc codant pour VgEcR et RXR dirigés par les promoteurs CMV et RSV respectivement sont modifiés par introduction d'un intron en 5' des séquences codantes (intron de pCI pour CMVp-VgEcR et intron  $\beta$ -globine de lapin pour RSVp-RXR) et sont introduits dans la région E1 d'un vecteur adénoviral selon la technique précédente.

Les séquences codant pour le FIX humain sont introduites en aval d'un promoteur inductible comprenant la séquence cible 5xE/GRE couplée au promoteur minimal  $\Delta$ hsp (pIND ; In Vitogen). Comme précédemment, la cassette est introduite dans les deux orientations dans le site *Bgl*II de pTG4664. La

recombinaison homologue avec pTG6401 digéré par *SfrI* permet de générer les plasmides portant la cassette inductible dans la région E3 en orientation sens ou anti-sens.

On obtient le vecteur adénoviral doublement recombinant par  
5 recombinaison homologue avec le vecteur de transfert contenant les séquences VgEcR et RXR.

#### EXEMPLE 4 : Production des adénovirus.

10 Les vecteurs adénoviraux recombinants contenant les cassettes d'expression des activateurs et/ou du FIX sont libérés des plasmides correspondants (pTG13083, pTG13092, pTG13233, pTG13234...) par digestion *PacI* avant d'être transfectés dans la lignée de complémentation 293. Le lysat  
15 cellulaire est récolté, soumis à trois étapes successives de congélation/décongélation afin de libérer les particules virales puis clarifié par centrifugation à 3500 rpm pendant 5 min. Les virions présents dans le surnageant peuvent être éventuellement amplifiés par passage sur une lignée permissive (293 ou A 549-E1+) et purifiés sur gradient de chlorure de césium selon les techniques de l'art. Le stock adénoviral est dialysé dans un tampon de formulation approprié  
20 tel que décrit dans WO98/02522 (par exemple saccharose 1M, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Tris-HCl 10 mM et Tween 80 0,1%). Le titre viral est déterminé en unités infectieuses par dosage de la protéine DBP par immunofluorescence (Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032) ou en nombre de particules virales par mesure spectrophotométrique à 260 nm.

25 Un vecteur contrôle est construit en insérant l'ADNc du facteur IX humain sous le contrôle du promoteur CMV isolé du plasmide pCI (Proméga). La cassette d'expression constitutive est introduite dans la région E3, donnant pTG13231 (orientation sens) et pTG13232 (orientation anti-sens). Les virions sont produits

selon la même méthodologie que ci-dessus.

Une recombinaison homologe entre les plasmides pTG13231 et pTG13232 et le plasmide pTG6401 linéarisé par *SrfI* permet d'obtenir respectivement les plasmides pTG13244 et pTG13245 portant la cassette d'expression constitutive CMV-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3.

**EXEMPLE 5 : Evaluation *in vitro* du système inductible par GR<sup>dex</sup>.**

- 10 Les vecteurs de transfert pTG13064, pTG6242 et pTG13063 portant respectivement les cassettes CMV-GR<sup>dex</sup>, LTR MMTV-FIX (sens) et LTR MMTV-FIX (anti-sens) sont transfectées de manière transitoire dans les cellules 293 (5µg d'ADN pour 10<sup>6</sup> cellules). En outre, le plasmide pTG13064 est co-transfecté avec soit pTG6242 ou pTG13063. Les cultures sont poursuivies en
- 15 présence de dexaméthasone (10<sup>-6</sup> M) ou en son absence. Les surnageants cellulaires sont prélevés 48, 96, 120 et 144 heures après transfection et la quantité de FIX produite est déterminée par ELISA (kit Asserachrom ; Diagnostica Stago). Les résultats présentés dans la Figure 1 montrent une induction de la production de FIX en présence de l'activateur GR<sup>dex</sup> activé par la dexaméthasone. Le
- 20 récepteur exprimé par pTG13064 est donc fonctionnel dans la mesure où à l'état activé (en présence de dexaméthasone), il peut se fixer sur les motifs GRE du MMTV et induire la transcription du gène FIX. L'activité basale du système est très faible. En effet, la quantité de FIX produite en l'absence de dexaméthasone ou de pTG13064 est faible, voire négligeable.
- 25 La cinétique d'expression du FIX en fonction du temps montre que le niveau de production maximal est atteint 120 h après la transfection. Au delà, la concentration stagne ce qui peut s'expliquer par l'état des cellules (à confluence) et un appauvrissement du milieu et probablement en dexaméthasone.

L'efficacité du système a également été évalué par infection adénovirale en présence de dexaméthasone ou non. Les cellules hôtes non permissives Vero ou A549 sont infectées par les virions AdTG13083 ou AdTG13092 portant les cassettes CMV-GR<sup>dex</sup> et MMTV-FIX (sens pour le premier virus et anti-sens pour le second) ou co-infectées par les adénovirus AdTG13075 (CMV-GR<sup>dex</sup>) et AdTG13082 (MMTV-FIX sens) ou AdTG13088 (MMTV-FIX anti-sens). On utilise une MOI (multiplicité d'infection) de 100 pour les expériences d'infection et 50 pour chacun des virus dans les cas de co-infection. La quantité de FIX produite dans les surnageants de culture est dosée par ELISA.

Dans les cellules Vero, l'expression du FIX n'est quantifiable qu'après infection par les virions AdTG13092 portant les deux cassettes et en présence de l'inducteur. Aucune induction n'a lieu en absence de dexaméthasone ou du récepteur GR<sup>dex</sup>. Il est à noter que ces cellules n'expriment pas le GR sauvage.

En cellule A549, le FIX est produit en présence de dexaméthasone dans les cellules infectées par AdTG13088 ou AdTG13092. Il est à noter que ces cellules expriment le GR sauvage. Cependant le niveau de FIX est différé dans le temps en l'absence de GR<sup>dex</sup> (virion AdTG13088).

En conclusion, le système inductible mettant en oeuvre le récepteur GR<sup>dex</sup> et la dexaméthasone est fonctionnel dans les constructions dans lesquelles la cassette inductible MMTV-FIX est en orientation anti-sens (AdTG13088 et AdTG13092). Par ailleurs, le système d'induction *en cis* (cassettes portées par un seul virus) est sensiblement plus productif qu'un système *en trans* mettant en oeuvre deux virus, notamment dans les cellules Vero.

Par ailleurs, l'étude a été reproduite en faisant varier les MOI. Les cellules Vero sont infectées par le virus AdTG13092 à une MOI de 10, 50 ou 100. A titre de contrôle, on utilise l'AdTG13075. Le dosage du FIX est effectué 48 et 72 h après l'infection. On observe une production de FIX quelque soit la MOI employée, mais le niveau optimal d'expression est obtenu pour une MOI de 50.

On a également fait varier la concentration en inducteur de  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  M. A forte concentration, la dexaméthasone s'avère cytotoxique se traduisant par une moindre expression du FIX. A faible concentration ( $10^{-8}$  M et au delà), l'induction n'est pas efficace. L'optimum se situe à  $10^{-7}$  M.

5 Une analyse de l'effet « dose-réponse » plus détaillée a été conduite en faisant varier la concentration en Dexaméthasone de  $10^{-9}$  à  $10^{-7}$  M. Cette étude a été réalisée en cellules A549 exprimant le récepteur GR sauvage. Une activation peut par conséquent avoir lieu par le biais de ce récepteur activable par la Dexaméthasone. En réalité, on observe pour une concentration en Dexaméthasone  
10 de  $10^{-8}$  M, que l'expression du Facteur IX ne peut être induite qu'après infection par le vecteur AdTG13092 codant pour le récepteur modifié GR<sup>dex</sup>. Cette concentration est ailleurs trop faible pour permettre l'activation du récepteur GR endogène (Figure 1). Par conséquent, nous avons montré que l'induction du gène rapporteur peut se faire de façon contrôlée et sélective, y compris en présence du  
15 récepteur GR sauvage, en utilisant des doses de ligand plus faibles. Cet aspect est important en vue d'applications *in vivo*, conditions naturelles pour lesquelles le récepteur GR sauvage est exprimé.

#### EXEMPLE 6 : Evaluation *in vivo* du système inductible par GR<sup>dex</sup>.

20 Le virus AdTG13092 est injecté par voie intraveineuse à des souris immunocompétentes C57Bl/6 à raison de  $4 \times 10^8$  ou  $8 \times 10^8$  ui. La dexaméthasone est administrée aux animaux par voie intrapéritonéale à une concentration de 100  $\mu$ g pendant 3 jours consécutifs (à J0, J1 et J2). Les sérum sont prélevés  
25 régulièrement à partir du 3ième jour suivant l'infection et la quantité de FIX produite est évaluée par ELISA. On observe dans ces conditions une production significative de FIX.

**EXEMPLE 7 : Evaluation *in vivo* du système inductible GR<sup>dex</sup> dans des souris immunocompétentes.**

Les virus AdTG13092, AdTG13088 et AdTG13245 sont injectés par voie  
5 intraveineuse à des souris immunocompétentes C57BI/6 à raison de  $5 \times 10^8$  iu. Les virus AdTG13088 et AdTG13075 (Figure 3) sont également co-injectés à raison de  $5 \times 10^8$  iu chacun.

La phase d'induction est réalisée en injectant par voie intrapéritonéale  
100 µg de Dexaméthasone pendant 3 jours consécutifs (à J0-J1-J2, J21-J22-J23  
10 et J42-J43-J44).

Les sérums des souris traitées sont prélevés à différents temps afin d'évaluer la production du Facteur IX par la technique ELISA.

Les résultats (Figures 4a, b, c et d) montrent que :

- 15 - l'expression du gène rapporteur Facteur IX est induite par la Dexaméthasone aussi bien après injection du vecteur AdTG13092 contenant la cassette d'expression du trans-activateur GR<sup>dex</sup> ainsi que la cassette inductible MMTV-FIX, qu'après co-injection de deux vecteurs portant chacun l'une de ces cassettes d'expression ;
- 20 - l'expression du FIX est également induite par la Dexaméthasone après injection du vecteur AdTG13088 seul. Dans ce cas, le niveau d'expression du FIX reste stable au cours des trois inductions. Cette induction est réalisée par le biais du récepteur GR sauvage, exprimé par les cellules murines et activable par la Dexaméthasone. Néanmoins, on peut noter qu'à la première induction, le niveau d'expression du FIX  
25 est 10 fois inférieur à celui obtenu dans le cas des souris exprimant le récepteur modifié GR<sup>dex</sup> ;
- aucune expression n'est détectée en absence de Dexaméthasone, quel que soit le vecteur injecté. On peut valablement en conclure que les

quantités de glucocorticoïdes endogènes sont trop faibles pour permettre l'activation du promoteur MMTV via le récepteur GR sauvage ;

- en présence du récepteur modifié GR<sup>dex</sup>, le niveau d'expression du FIX est comparable au promoteur constitutif CMV.

**EXEMPLE 8 : Evaluation *in vitro* du système inductible par GR<sup>dex</sup> dans des souris immunodéficientes.**

Les virus AdTG13092, AdTG13088 et AdTG13245 (voir Figure 3) sont injectés par voie intraveineuse à des souris immunodéficientes *scid/scid* à raison de  $5 \times 10^8$  iu. Les virus AdTG13088 et AdTG13075 sont également co-injectés à raison de  $5 \times 10^8$  iu chacun. L'induction est réalisée en injectant par voie intrapéritonéale 100 µg de Dexaméthasone pendant 3 jours consécutifs (à J0-J1-J2, J21-J22-J23 et J42-J43-J44).

Les sérums des souris sont prélevés à différents temps afin d'évaluer la production du FIX par la technique ELISA.

Les résultats (Figures 5a, b, c et d) sont comparables à ceux observés dans le cas de souris immunocompétentes :

- l'expression du FIX est induite après injection de Dexaméthasone chez les souris exprimant le récepteur modifié GR<sup>dex</sup> (injection AdTG13092 ou AdTG13088+AdTG13075). Le niveau d'induction chute d'un log après la deuxième et la troisième injections de ligand, puis reste stable pendant la durée de l'expérience (7 mois). Les niveaux d'induction sont comparables en *cis* (injection d'un vecteur adénoviral unique) et en *trans* (injection de deux vecteurs adénoviraux) ;
- l'expression du FIX est induite par la Dexaméthasone après injection du vecteur AdTG13088, par le biais du récepteur GR sauvage. Le

- niveau d'induction est stable au cours du temps ;
- aucune expression basale du FIX n'est détectée en absence de Dexaméthasone, quel que soit le vecteur injecté ;
  - le niveau d'induction en présence du GR<sup>dex</sup> est comparable à l'expression du gène liée au promoteur constitutif CMV (du moins lors de la première induction) ;
  - des études complémentaires ont permis de montrer la présence de l'ADN viral par Southern blot, ainsi que l'expression du GR<sup>dex</sup> par Northern blot, après injection du vecteur AdTG13092 ou AdTG13075 (au moins jusqu'à 56 jours après injection des vecteurs adénoviraux).

**EXEMPLE 9 : Evaluation d'une dose-réponse *in vivo* dans des souris immunodéficientes..**

Les vecteurs AdTG13092 et AdTG13088 sont injectés par voie intraveineuse à des souris immunodéficientes *scid/scid* à raison de  $5 \times 10^8$  iu. L'induction est réalisée en injectant par voie intrapéritonéale 50 ou 5 µg de Dexaméthasone pendant 3 jours consécutifs (à J0-J1-J2 et J21-J22-J23). Les sérums sont prélevés à différents temps afin d'évaluer la production du FIX par ELISA.

Des études préalables ont permis de montrer que l'injection de  $3 \times 100$  µg,  $3 \times 50$  µg ou  $3 \times 20$  µg de Dexaméthasone permet d'obtenir des niveaux d'induction équivalents. Dans cette étude, les inventeurs ont identifié une dose de ligand permettant d'activer l'expression du gène rapporteur via le récepteur modifié GR<sup>dex</sup> apporté par un vecteur adénoviral (AdTG13092), mais incapable d'activer cette expression par le biais du GR endogène (injection AdTG13088).

L'injection de  $3 \times 5$  µg de Dexaméthasone permet d'activer l'expression du FIX en présence du GR<sup>dex</sup>, mais est incapable d'activer cette expression par

l'intermédiaire du GR endogène (Figure 6). Cette dose permet par conséquent d'activer l'expression du transgène de façon contrôlée et sélective, même en présence du récepteur sauvage.

5     **EXEMPLE 10 : Mise au point d'un système d'expression inductible capable de prévenir le développement d'une réponse immunitaire après administration *in vivo* de vecteur adénoviral.**

10     Les vecteurs adénoviraux représentent un système de choix pour transférer un gène thérapeutique chez un patient. Cependant, l'expression du transgène est généralement transitoire. Pour cette raison, il est nécessaire de répéter les administrations du vecteur adénoviral afin d'assurer une expression prolongée du gène thérapeutique. Malheureusement, une première injection d'adénovirus entraîne fréquemment le développement d'une réponse immunitaire qui empêche  
15     toute nouvelle administration. Dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont développé une nouvelle approche reposant sur l'expression d'une molécule immunosuppressive capable d'empêcher la mise en place de cette réponse immunitaire anti-adénovirus. Pour cela, les inventeurs ont inséré le gène codant pour l'interleukine-10 (IL-10) dans un système d'expression inductible porté par  
20     un vecteur adénoviral. L'expression régulée et contrôlée de l'IL-10 permet ainsi la mise au point de protocoles pour lesquels la réadministration de vecteurs portant le gène thérapeutique est possible.

25     a) Implication de la réponse immunitaire dans la persistance des adénovirus recombinants

- Réponse immunitaire cellulaire :

*Vecteur délété des régions E1 et E3*

L'importance de la réponse immunitaire a été mise en évidence lors d'expériences réalisées dans des souris immunocompétentes ou immunodéficientes

(Yang Y., F. A. Nunes, K. Berencsi, E. E. Furth, E. Gönczöl and J. M. Wilson. 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 :4407-4411). Ainsi, l'expression du gène rapporteur *lacZ* est transitoire après injection du vecteur adénoviral dans des souris immunocompétentes, mais stable dans des souris immunodéficientes. Ces études  
5 suggèrent donc que les cellules transduites sont détruites par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). En outre, il a été montré que la génération des CTL est induite par les particules virales injectées, et non seulement par les protéines virales néo-synthétisées.

10           *Vecteur délété des régions E1, E3 et E4 ou E2a*

Les délétions des régions E4 ou E2a font disparaître toute expression résiduelle de protéine virale. Toutefois, la toxicité n'est pas diminuée en éliminant la région E2a. Par contre la délétion de la région E4 conduit à une diminution  
15 significative de la toxicité hépatique après injection intraveineuse. Malgré une persistance de l'ADN, l'expression du transgène est toutefois souvent réduite de façon importante.

- Réponse immunitaire humorale

Plus de 85% de la population mondiale est immunisée contre l'adénovirus  
20 et possède des anticorps anti-adénovirus dirigés contre les sérotypes 2 ou 5. Si aucune ré-infection ne se produit, le titre en anticorps neutralisants chute pour atteindre un niveau indétectable au bout de 2 ans. Ces anticorps peuvent empêcher la fixation du virus sur le récepteur membranaire et sa translocation dans le cytoplasme.

25           Quelles que soient les délétions du génome adénoviral, le système immunitaire humoral est susceptible de reconnaître les protéines de la capside virale et de produire des anticorps neutralisants anti-adénovirus. Des stratégies d'immunosuppression sont donc requises pour permettre une réadministration.

b) Stratégie d'immunosuppression de la réponse immunitaire humorale

L'interleukine-10 est connue pour avoir des propriétés immunosuppressives et a montré des résultats prometteurs dans le cas des rejets de greffe et dans des traitements anti-inflammatoires. L'IL-10 est sécrétée par de nombreuses cellules (monocytes / macrophages, cellules T, cellules B après activation par un antigène) et a de nombreuses cellules cibles (dont les monocytes / macrophages, les cellules B, les cellules T, les neutrophiles et les cellules endothéliales). Elle a un effet pléiotropique et possède des activités immunostimulatrices ou immunosuppressives selon le type cellulaire. Les interleukines-10 humaine et de rat sont très homologues, 84 % d'homologie au niveau nucléotidique et 73% au niveau protéique.

L'IL-10 a un effet immunosuppresseur sur les monocytes/macrophages. Elle inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, ainsi que l'expression du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation. Elle limite aussi la durée de la réponse inflammatoire des granulocytes et des éosinophiles.

A l'opposé, l'IL-10 stimule la viabilité, la sécrétion d'anticorps et l'expression du CMH de classe II des lymphocytes B. Elle possède également un rôle de stimulation sur les mastocytes et sur les cellules T CD8<sup>+</sup>. Globalement, l'IL-10 a toutefois un très fort effet immunosuppresseur.

Les propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives de l'IL-10 pourraient intervenir dans la suppression de la production d'anticorps neutralisants contre l'adénovirus recombinant. En effet, la co-injection d'adénovirus codant pour l'IL-10 et pour la  $\beta$ -galactosidase empêche l'induction de la réponse immunitaire contre le virus et la production de CTL, permettant ainsi une expression prolongée du gène rapporteur.

Cependant, une immunosuppression prolongée est associée à des effets secondaires non négligeables il est donc souhaitable d'obtenir une immunosuppression de façon transitoire et régulable.

## c) Système inductible selon l'invention

Le système que nous avons développé est basé sur l'induction par les hormones. En effet, celles-ci vont se fixer sur leur récepteur nucléaire, constitué  
5 d'un domaine de fixation à l'hormone, d'un domaine de fixation à l'ADN et d'un domaine de transactivation. Après changement conformationnel et fixation sur les éléments cibles localisés au niveau de l'ADN, la transcription du gène situé en aval du promoteur régulable sera ainsi activée. Afin d'éviter toutefois l'activation par les hormones endogènes, éléments non contrôlables, les inventeurs ont choisi  
10 d'utiliser des récepteurs modifiés au niveau du domaine de fixation à l'hormone. Ces récepteurs mutés tels que les récepteurs aux œstrogènes ou à la progestérone sont capables de répondre à des ligands exogènes synthétiques, mais pas aux hormones endogènes.

Les inventeurs ont développé un système basé sur le récepteur aux glucocorticoïdes modifié, GR<sup>dex</sup>, capable d'induire l'expression du transgène situé  
15 en aval des éléments GRE (Glucocorticoid Responsive Element) après activation par la dexaméthasone, mais pas par les glucocorticoïdes endogènes. Au cours de cette étude, différents vecteurs adénoviraux exprimant l'IL-10 de façon inductible ont été générés, afin d'évaluer leurs effets sur la réponse immunitaire anti-  
20 adénovirus.

## d) Génération des vecteurs adénoviraux

Tous les vecteurs adénoviraux dérivent du plasmide pTg6401 comportant le génome de l'adénovirus humain de type 5 délété des nucléotides 459 à 3327  
25 (région )E1) et des nucléotides 28 592 à 30 470 (région )E3).

Insert en E1 : Le gène modifié GR<sup>dex</sup> est introduit dans la région E1 du génome de l'adénovirus de type 5 par recombinaison homologue entre le plasmide pTg6401 et le plasmide de transfert contenant l'ADNc GR<sup>dex</sup> sous contrôle du

promoteur CMV (Cytomegalovirus), d'un intron chimérique (pCI, Promega) et d'un signal de polyadénylation du SV40.

Insert en E3 : L'ADNc de l'IL-10 de rat (Feng L., W.W. Tang, J.C. Chang and C.B. Wilson. 1993. Biochem. Biophys Res. Commun.. 192 :452-45) a été obtenu par PCR inverse sur les ARNm totaux de cellules de rat au moyen des oligonucléotides OTG12237 (CTAGTCTAGA CCACCATGCT TGGCTCAGCA CTGCT=SEQ ID N° 1) et OTG12243 (TTTATAGCGG CCGCTCAATT TTTCATTTTG AGTG=SEQ ID N° 2), par 30 cycles de dénaturation (1 minute à 95°C), hybridation des amorces (1 minute à 65°C) et extension (1 minute à 72°C). L'ADNc est placé en aval de 4 éléments de réponse aux glucocorticoïdes GRE (Glucocorticoid Responsive Element) contenus dans le promoteur LTR du MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus). Cette cassette d'expression est introduite dans le plasmide de transfert délété de la région E3 dans l'orientation anti-sens par rapport à la région E3 sauvage de l'adénovirus.

Une recombinaison homologe de ce vecteur de transfert avec les vecteurs adénoviraux Ad-GR<sup>dex</sup> ou pTg6401 permet de générer respectivement soit un vecteur portant la cassette d'expression de l'activateur en E1 et la cassette inductible en E3 en orientation antisens (Ad-GR<sup>dex</sup>-MMTV/IL-10-E4 sauvage) soit un vecteur contenant uniquement la cassette d'induction en E3 (Ad-ΔE1-MMTV/IL10-E4 sauvage).

L'ADNc de l'IL-10 de rat a également été placé sous contrôle du promoteur CMV. Cette cassette d'expression constitutive a été insérée dans la région E3 de pTg6401 en orientation antisens (Ad-ΔE1-CMV/IL10).

Toutes les constructions de deuxième génération sont obtenues par recombinaison homologe entre le plasmide de transfert contenant les cadres de lecture 3 et 4 (ORF3,4) de la région E4 et les vecteurs de première génération précédents.

L'ensemble des constructions de première et de deuxième générations sont

illustrées dans la Figure 7.

e) Evaluation de l'expression de l'IL-10 *in vitro*

*Transfection transitoire dans des cellules 293*

5 Les cellules 293 sont transfectées par les plasmides de transfert contenant les cassettes d'expression de l'interleukine-10 de rat en présence ou non de la cassette d'expression de l'activateur GR<sup>dex</sup>. Elles sont mises en culture en présence ou non de dexaméthasone ( $10^{-7}$  M) en DMEM 10% SVF. Les surnageants sont prélevés à différents temps afin d'analyser l'expression du transgène.

10

*Validation in vitro des adénovirus recombinants dans des cellules A549 et VERO*

Les cellules A549 et VERO sontensemencées la veille à  $3 \cdot 10^5$  cellules dans des plaques de 6 puits. Les cellules sont infectées à une MOI de 50 avec les  
15 différents préstocks viraux dans 250 µl DMEM 2% SVF. Après 30 minutes d'adsorption à 37°C, 3ml de DMEM 2% SVF sont rajoutés sur les cellules en présence ou non de dexaméthasone  $10^{-7}$ M. Les surnageants sont prélevés à différents temps afin d'analyser l'expression du transgène.

20 *Quantification de l'expression de l'IL-10 de rat par test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)*

La détection de l'IL-10 de rat est réalisée à l'aide du kit OptEIA<sup>TM</sup> (Pharmingen). Les kits sont utilisés selon les spécifications des fabricants.

25 L'induction de l'IL-10 par la dexaméthasone a été évaluée par transfection transitoire des plasmides de transfert dans des cellule 293. La capacité d'induction est analysée en co-transfectant le vecteur de transfert MMTV-IL10 avec le vecteur exprimant le trans-activateur GR<sup>dex</sup>. La transfection du plasmide MMTV-IL10 seul indiquera le niveau d'expression de l'IL-10 en absence du trans-activateur. De plus, le niveau d'induction est comparé à l'expression constitutive de l'IL-10 sous

contrôle du promoteur CMV, en transfectant également ce plasmide dans les cellules 293. L'induction est réalisée en présence ou non de dexaméthasone à une concentration de  $10^{-7}$  M. Les surnageants de culture sont prélevés 72 et 120 heures après la transfection afin de quantifier l'IL-10 par kit ELISA. La co-transfection des plasmides MMTV-IL10 et GR<sup>dex</sup> en présence de dexaméthasone permet l'induction de l'IL-10 (50 ng / ml à 120 H post-transfection).

Les inventeurs ont démontré que l'apport du trans-activateur GR<sup>dex</sup> et du ligand dexaméthasone permet une induction de l'expression de l'IL-10 sous contrôle du promoteur inductible MMTV.

L'efficacité d'induction de l'IL-10 par la dexaméthasone couplée au GR<sup>dex</sup> a été évaluée *in vitro* par infection des cellules humaines A549 et des cellules simiennes VERO avec les vecteurs Ad-MMTV-IL10 ± AdGR<sup>dex</sup> ou Ad-GR<sup>dex</sup>-MMTV-IL10. Ces deux types d'infection permettent d'évaluer l'efficacité d'induction en *trans* ou en *cis*. Les cultures cellulaires sont réalisées en présence ou non de dexaméthasone  $10^{-7}$  M. Les quantités d'IL-10 obtenues seront comparées à celle obtenues après infection par Ad-CMVIL-10 exprimant cette cytokine de façon constitutive. D'autre part, l'induction de l'IL-10 est comparée à celle du facteur IX humain inséré dans les mêmes constructions, évaluées *in vitro* au préalable. Les surnageants sont prélevés à 24, 48, 72 et 96 heures post-infection afin de quantifier l'IL-10 et le facteur IX produits, au moyen de kits ELISA.

En cellules VERO, l'expression de l'IL-10 est induite lorsque les cellules sont co-infectées par Ad-MMTV-IL10 + Ad-CMV-GR<sup>dex</sup> en présence de dexaméthasone, pour atteindre 50,8 ng/ml 96 heures après infection. En absence du ligand, l'IL-10 est à peine détectable (1,2 ng/ml). Au contraire, en absence du trans-activateur GR<sup>dex</sup>, aucune induction significative de l'expression de l'IL-10 ne peut être notée (3 ng/ml en présence de dexaméthasone, correspondant à l'expression résiduelle obtenue en transfection transitoire ; 0,7 ng/ml en absence de dexaméthasone).

Les inventeurs ont donc pu démontrer qu'en cellules VERO, l'expression

de l'IL-10 peut être induite par la dexaméthasone couplée au GR<sup>dex</sup> en « *trans* », lorsque les deux cassettes d'expression sont portées par deux vecteurs adénoviraux différents.

En cellules A549, ils ont également pu vérifier la fonctionnalité du système  
5 inductible en « *trans* ». En effet, la concentration en IL-10 atteint 32,3 ng/ml en présence de dexaméthasone après co-infection par les vecteurs Ad-MMTV-IL10 + Ad-CMV-GR<sup>dex</sup>. En absence de ligand, la cytokine est indétectable. L'expression de l'IL-10 est également induite par la dexaméthasone après infection par le vecteur Ad-MMTV-IL10 seul. Cette activation se fait par le biais du récepteur GR  
10 sauvage exprimé par les cellules A549.

### REVENDICATIONS

1. Système d'expression inductible comprenant :
  - (i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel d'origine eucaryote ou virale, placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte, et
  - (ii) un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.
2. Système d'expression selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel comprend au moins un domaine de trans-activation, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand (DLL).
3. Système d'expression selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel comporte tout ou partie d'un domaine dérivé d'un récepteur d'hormones stéroïdes choisi parmi le groupe constitué par les récepteurs oestrogène (ER), glucocorticoïde (GR), progestérone (PR), Vitamine D, ecdysone (EcR), minéralocorticoïde, androgène, hormone thyroïde, acide rétinoïque et acide rétinoïque X ou encore d'une immunophiline ou d'un récepteur aryl hydrocarbon (AhR).
4. Système d'expression selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel est choisi parmi :
  - (i) un polypeptide désigné GR<sup>dex</sup> comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivés d'un récepteur aux glucocorticoïdes, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment

par substitution de l'isoleucine en position 747 par une thréonine ;

- (ii) un polypeptide désigné ER<sup>T</sup> comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivé d'un récepteur à l'oestrogène, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment par substitution de la glycine en position 521 par une arginine ;
- (iii) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un DLL dérivé du récepteur à l'ecdysone, un domaine de liaison à l'ADN hybride dérivé de ceux des récepteurs EcR et GR et un domaine de trans-activation dérivé de la protéine virale VP16 et un second polypeptide dérivé de la protéine USP de drosophile ou d'un homologue tel que le récepteur de l'acide rétinoïque X (RXR) humain ;
- (iv) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un domaine de liaison à l'ADN dérivé du facteur de transcription ZFHD1 et un DLL dérivé de l'immunophiline FKBP12 et un second polypeptide comportant un domaine de trans-activation dérivé du facteur NFκB p65 et un DLL dérivé de FRAP (FKBP12-rapamycine-associated protein) ; et
- (v) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide dérivé du récepteur AhR et un second polypeptide dérivé de la protéine Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator).

5. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce en ce que ledit activateur transcriptionnel comprend un DLL et un domaine de trans-activation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, notamment dérivé de la protéine de levure Gal4.

6. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel est activé par liaison d'un inducteur non naturel et

n'est pas ou peu activé par un composé humain naturel.

7. Système d'expression selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit inducteur non naturel est une substance synthétique administrable par voie orale.

5

8. Système d'expression selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit inducteur est choisi parmi le groupe constitué par la dexaméthasone, le tamoxifène, le muristérone A, l'ecdysone, la rapamycine et le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine ou un analogue de ces composés.

10

9. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt code pour un ARN anti-sens, un ribozyme, ou encore un polypeptide d'intérêt.

15

10. Système d'expression selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit polypeptide d'intérêt est choisi parmi le groupe constitué par les chémokines, les cytokines, les récepteurs cellulaires, les ligands, les facteurs de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, les facteurs de croissance, les enzymes, les inhibiteurs d'enzyme, les polypeptides à effet anti-tumoral, les polypeptides capables d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire ou virale, les polypeptides agissant sur l'apoptose, les agents cytostatiques, les immunoglobulines, les apolipoprotéines, les produits cytotoxiques, les produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, les antigènes associés aux tumeurs, les immunotoxines, les inhibiteurs d'angiogénèse et les marqueurs.

20

25

11. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que ledit promoteur inductible comprend une ou plusieurs séquence(s) cible(s) répondant à un activateur transcriptionnel tel que défini dans l'une des revendications 2 à 8.

12. Système d'expression selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite séquence cible est une séquence ERE, GRE, EcR, UAS, 5xE/GRE, XRE ou une séquence cible répondant au facteur de transcription ZFDH-1.

5

13. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques et leurs éléments de régulation sont portés par ledit vecteur adénoviral recombinant.

10 14. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques et leurs éléments de régulation sont portés par un vecteur d'expression indépendant autre que ledit vecteur adénoviral recombinant.

15 15. Système d'expression selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit vecteur indépendant est un vecteur synthétique, un plasmide ou un vecteur viral, notamment dérivé d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus associé à l'adénovirus (AAV), d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus, d'un parvovirus, d'un poxvirus (fowlpox, canaripox, virus de la vaccine..) ou d'un foamyvirus.

20

16. Système d'expression selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et, le cas échéant, ledit vecteur adénoviral indépendant sont déficients pour la fonction E1 par délétion de tout ou partie de la région E1 ou mutation non fonctionnelle de cette dernière.

25

17. Système d'expression selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et/ou ledit vecteur adénoviral indépendant est/sont en outre déficient(s) pour au moins l'une des fonctions E2, E4, L1, L2, L3, L4 et/ou L5.

18. Système d'expression selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et/ou ledit vecteur adénoviral indépendant est/sont en outre dépourvu(s) de tout ou partie de la région non essentielle E3.
- 5
19. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et, le cas échéant, ledit vecteur indépendant sont sous forme de particules virales infectieuses.
- 10 20. Vecteur adénoviral recombinant comprenant
- (i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte, et
  - (ii) un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible
- 15 susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.
21. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 20, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques codent pour un activateur transcriptionnel selon l'une des revendications 2 à 6 ou pour un activateur transcriptionnel
- 20 procaryotique, notamment un polypeptide comprenant un DLL et un domaine de liaison à l'ADN dérivé d'un répresseur de l'opéron tétracycline.
22. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 21, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques codent pour le polypeptide tTA comprenant
- 25 un répresseur de l'opéron tétracycline (tetR) fusionné en phase à un domaine d'activation de la transcription dérivé de la protéine virale VP16.
23. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisé en ce que ledit inducteur non naturel est tel que défini dans la

revendication 7 ou 8 ou est constitué par la doxycycline ou la tétracycline.

24. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 23,  
caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt est tel que défini dans la revendication 9  
5 ou 10.

25. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 24,  
caractérisé en ce que ledit promoteur inductible est tel que défini dans la  
revendication 11 ou 12 ou comprend une ou plusieurs séquence(s) cible(s) tetO.  
10

26. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 25,  
caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant est tel que défini dans  
l'une des revendications 16 à 18.

15 27. Particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral recombinant  
selon l'une des revendications 20 à 26.

28. Procédé de préparation d'une particule virale selon la revendication 27, dans  
lequel :

- 20 (i) on introduit un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des  
revendications 20 à 26 dans une cellule de complémentation capable  
de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une  
cellule de complémentation transfectée,
- 25 (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des  
conditions appropriées pour permettre la production de ladite  
particule virale, et
- (iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

29. Cellule eucaryote comprenant un système d'expression selon l'une des  
30 revendications 1 à 19, un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des

revendications 20 à 26 ou une particule virale infectieuse selon la revendication 27.

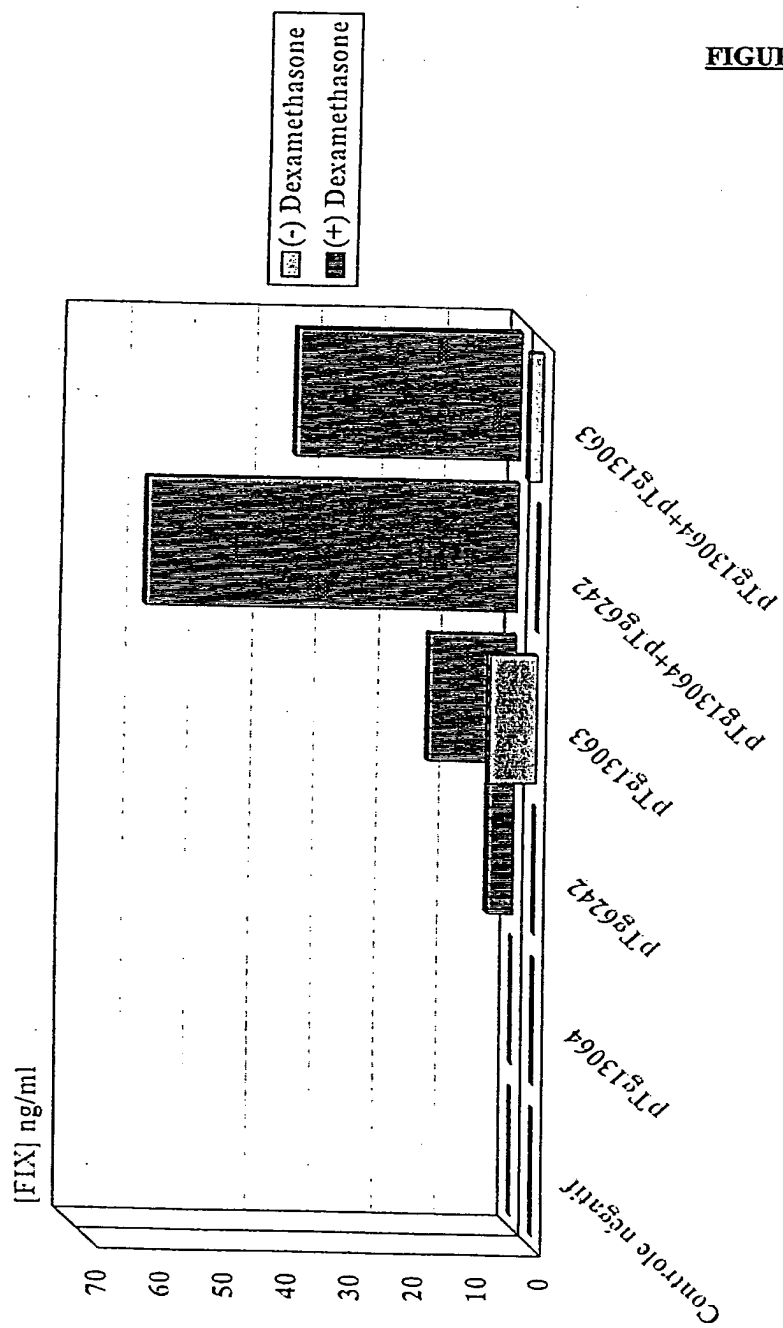
5 30. Composition pharmaceutique comprenant un système d'expression selon l'une des revendications 1 à 19, un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26, une particule virale infectieuse selon la revendication 27 ou une cellule eucaryote selon la revendication 29 et un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

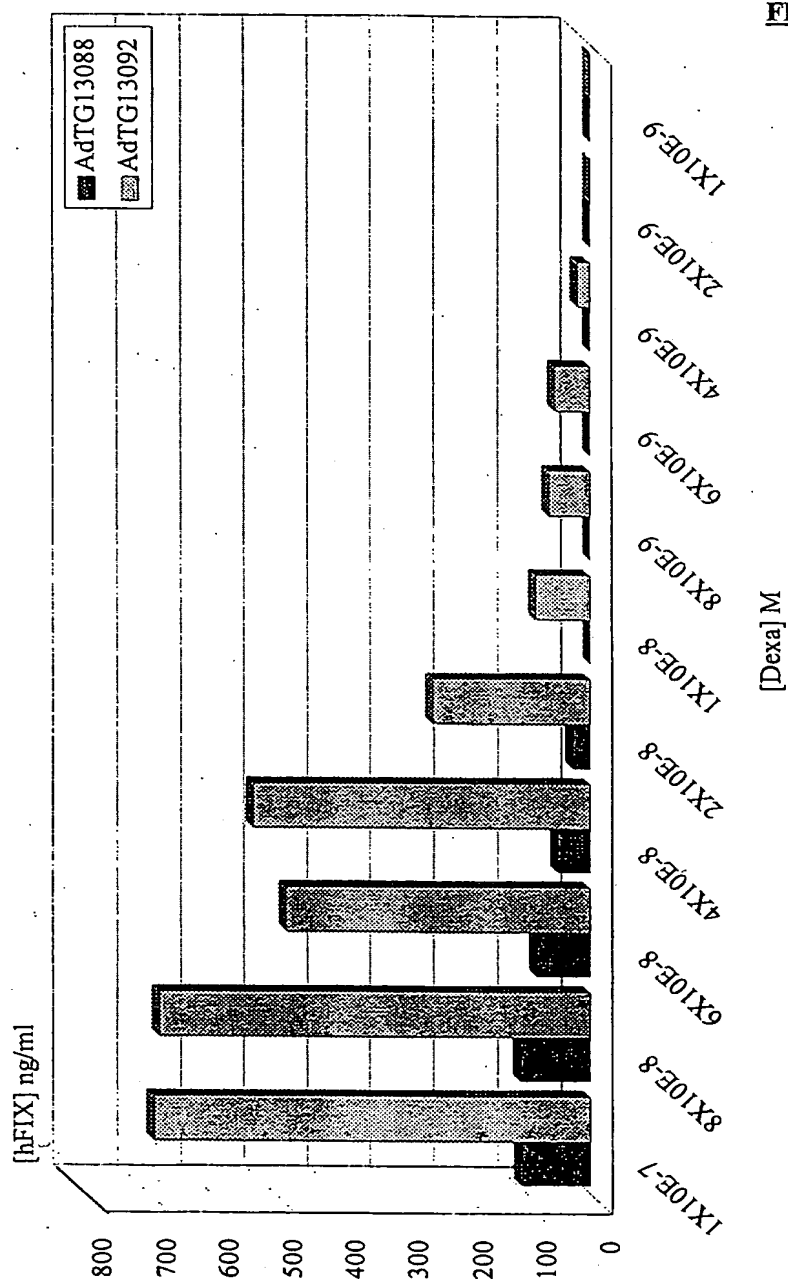
10 31. Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce en ce qu'elle est sous forme injectable.

15 32. Utilisation d'un système d'expression selon l'une des revendications 1 à 19, d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26, d'une particule virale infectieuse selon la revendication 27 ou d'une cellule eucaryote selon la revendication 29, pour la préparation d'un médicament destiné au transfert et à l'expression dudit gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte.

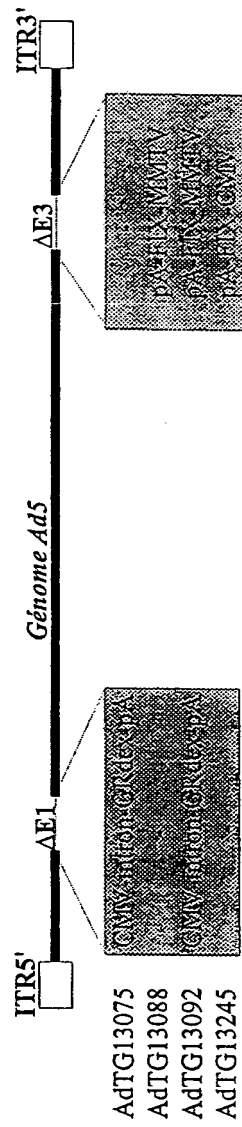
20 33. Utilisation d'un système d'expression selon l'une des revendications 1 à 19, d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26, d'une particule virale infectieuse selon la revendication 27 ou d'une cellule eucaryote selon la revendication 29, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies par thérapie génique.

25 34. Activateur transcriptionnel comprenant un DLL et un domaine de trans-activation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, notamment dérivé de la protéine de levure Gal4.

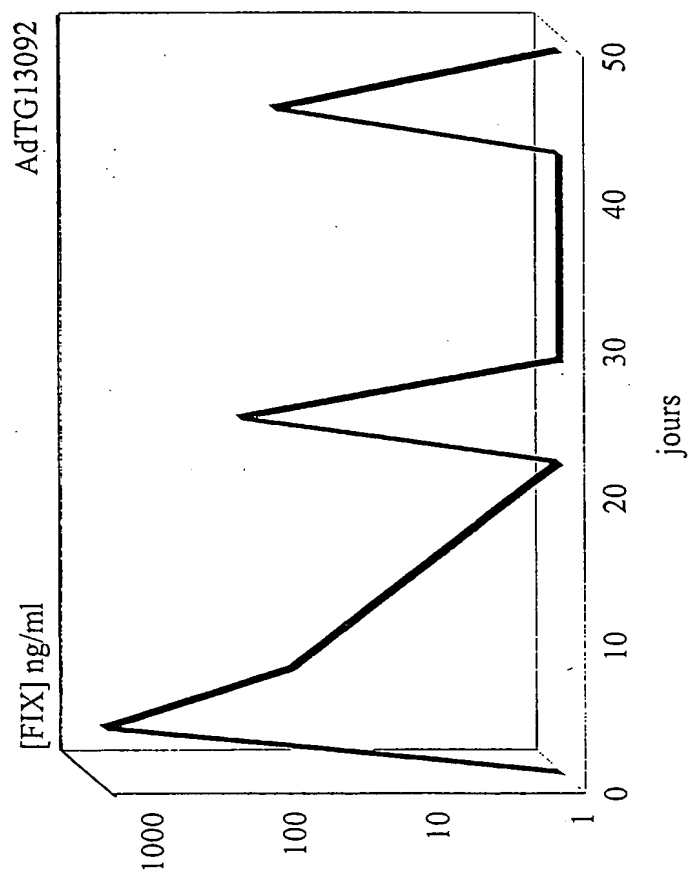
**FIGURE 1**

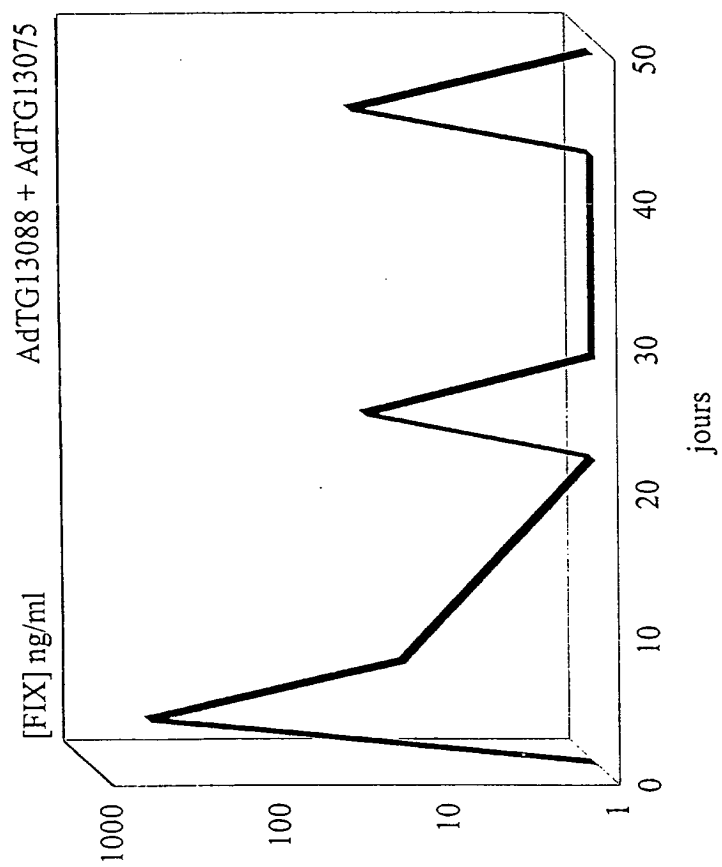
**FIGURE 2**

**FIGURE 3**

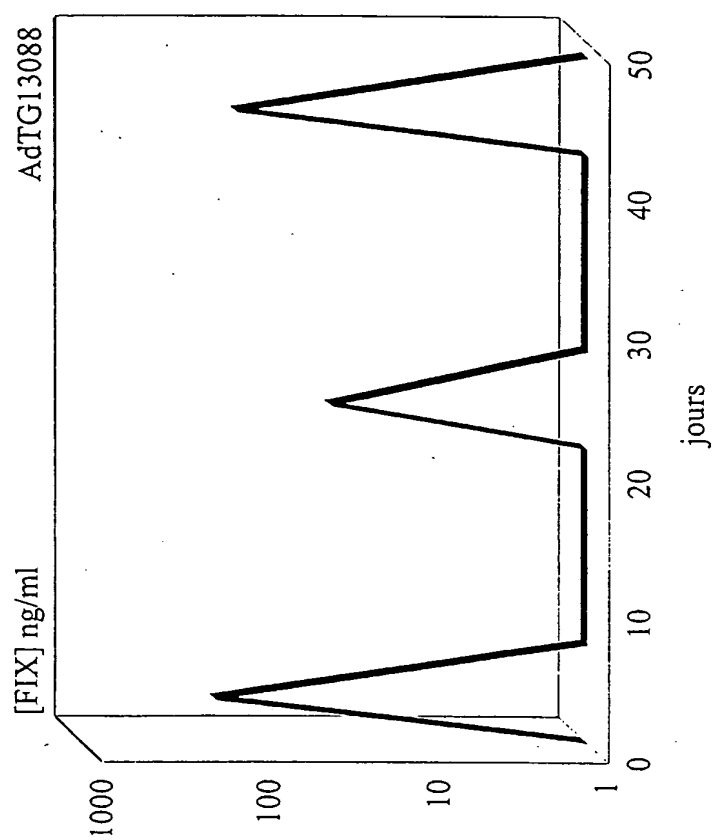


**FIGURE 4a**



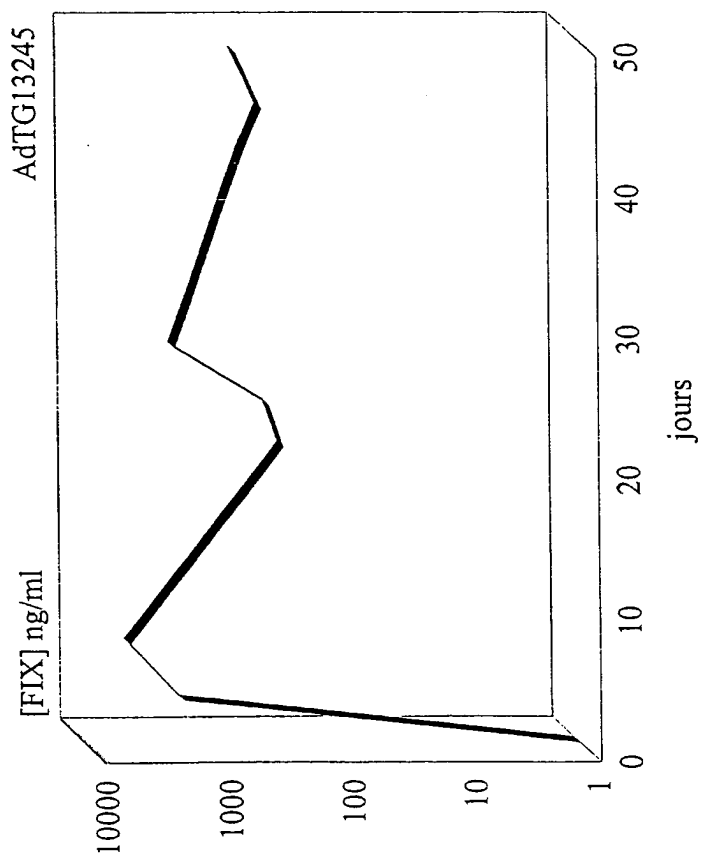
**FIGURE 4b**

6/13

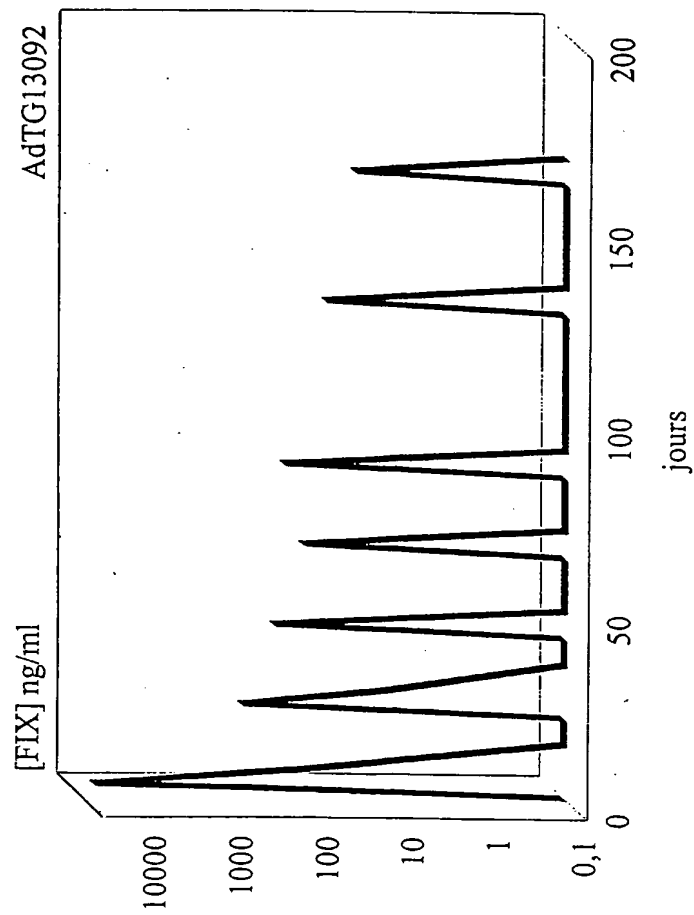
**FIGURE 4c**

7/13

**FIGURE 4d**

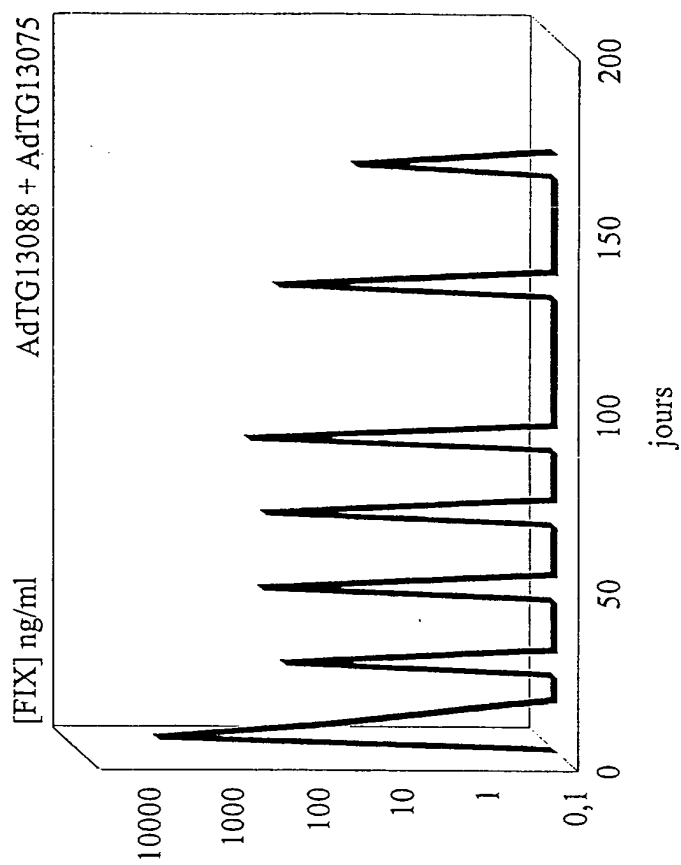


**FIGURE 5a**



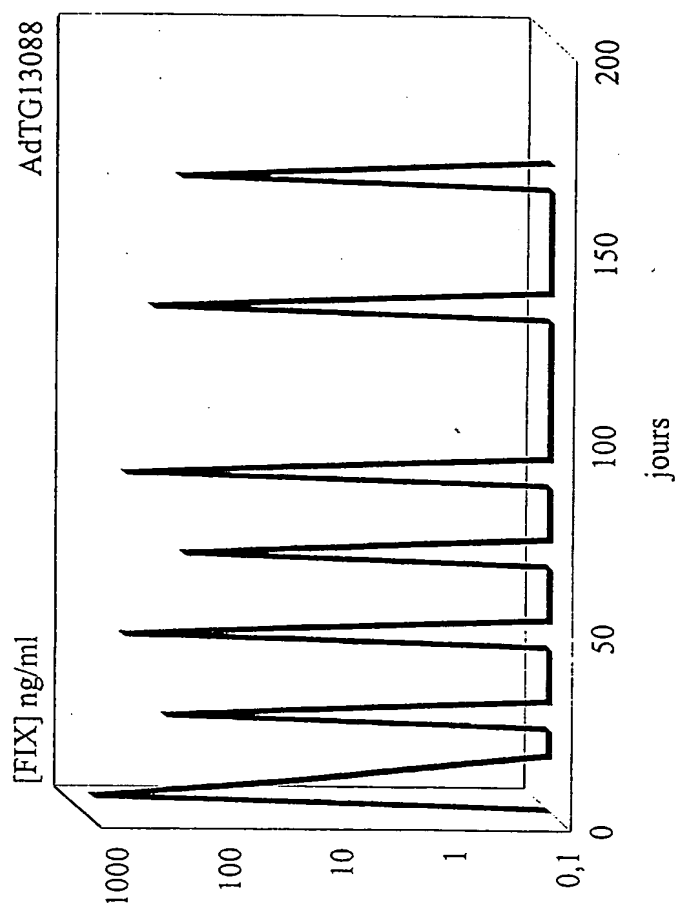
9/13

**FIGURE 5b**

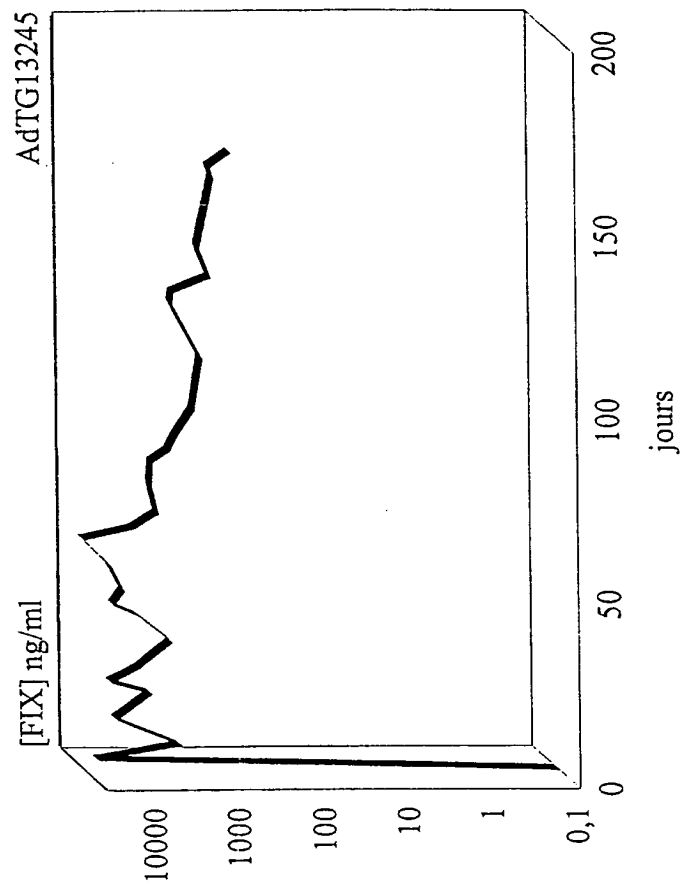


10/13

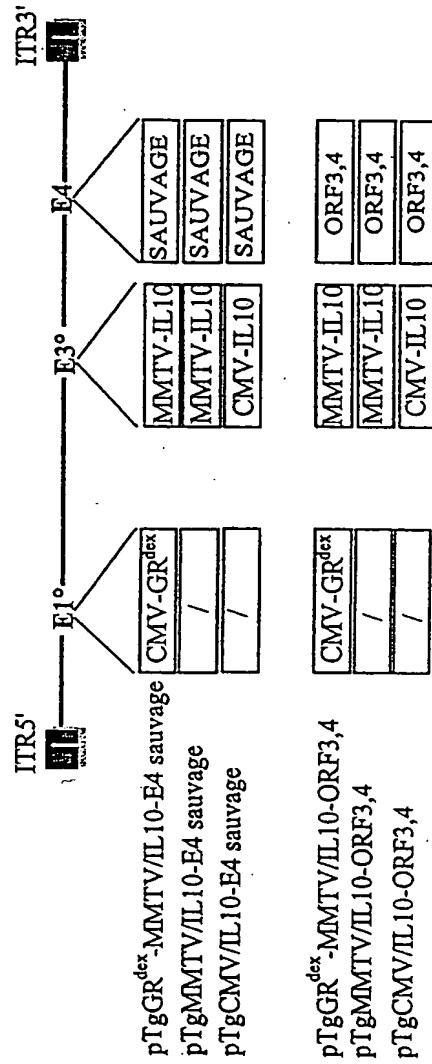
**FIGURE 5c**



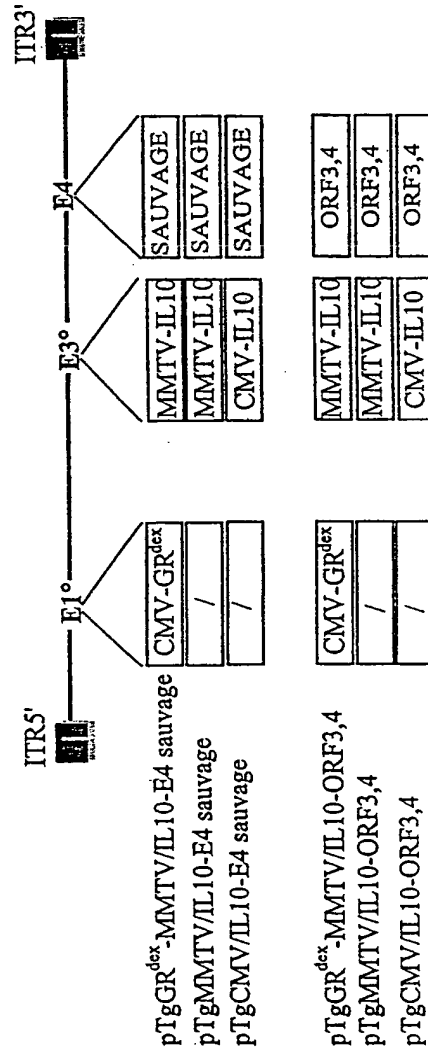
**FIGURE 5d**



**FIGURE 7**



**FIGURE 7**



## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; TRANSGENE

&lt;120&gt; SYSTEME D'EXPRESSION INDUCTIBLE

&lt;130&gt; D17688

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; OTG12237

&lt;400&gt; 1

ctagtctaga ccaccatgct tggctcagca ctgct

35

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; OTG12243

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 2

tttatagcgg ccgctcaatt tttcattttg agtg

34

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

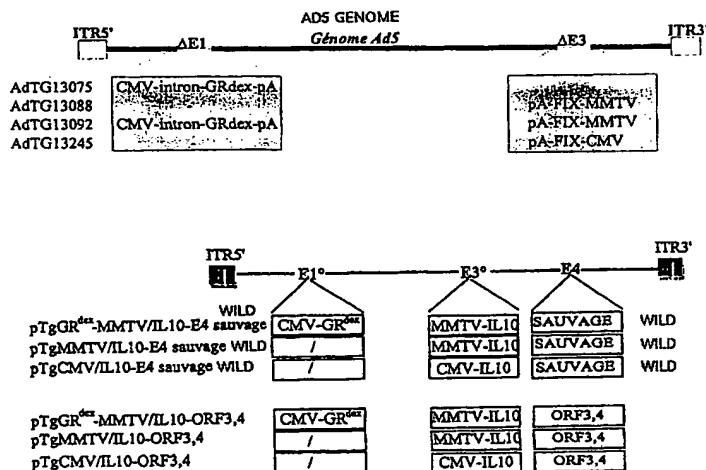
(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> : <b>C12N 15/861, 15/62, 5/10, A61K 48/00</b>	A3	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 00/12741</b> (43) Date de publication internationale: 9 mars 2000 (09.03.00)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02051 (22) Date de dépôt international: 27 août 1999 (27.08.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/10842 28 août 1998 (28.08.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MEHTALI, Majid [FR/FR]; 16, Impasse de Reims, F-67400 Illkirch-Graffenstaden (FR). SORG-GUSS, Tania [FR/FR]; 3, Impasse du Ruisseau, F-67330 Dossenheim sur Zinsel (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).	(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale. (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 4 mai 2000 (04.05.00)	

(54) Title: INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEM

(54) Titre: SYSTEME D'EXPRESSION INDUCTIBLE

(57) Abstract

The invention concerns an inducible expression system using nucleotide sequences coding for a transcriptional activator of eukaryotic or viral origin and a recombinant adenoviral vector comprising a gene of interest placed under the control of a promoter inducible *in trans* by said transcriptional activator. The invention also concerns a recombinant adenoviral vector bearing a first expression cassette coding for a transcriptional activator and a second cassette bearing a gene of interest placed under the control of a promoter inducible *in trans* by said transcriptional activator. The invention further concerns an infectious viral particle, its preparation method, a eukaryotic cell and a pharmaceutical composition comprising such a vector or expression system as well as their use for therapeutic or prophylactic purposes.



(57) Abrégé

La présente invention concerne un système d'expression inductible mettant en oeuvre les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel d'origine eucaryote ou virale et un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur transcriptionnel. Elle a également pour objet un vecteur adénoviral recombinant portant une première cassette d'expression codant pour un activateur transcriptionnel et une seconde cassette portant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur transcriptionnel. L'invention a également trait à une particule virale infectieuse, son procédé de préparation, une cellule eucaryote et une composition pharmaceutique comprenant un tel vecteur ou système d'expression ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques ou prophylactiques.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02051

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/861 C12N15/62 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NARUMI K ET AL: "Intermittent, repetitive corticosteroid-induced upregulation of platelet levels after adenovirus-mediated transfer to the liver of a chimeric glucocorticoid-responsive promoter controlling the thrombopoietin cDNA" BLOOD, vol. 92, no. 3, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 822-833, XP002104566	1-3
Y	abstract --- -/-	4-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 2000

Date of mailing of the international search report

22. 02. 00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lonnoy, O

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.  
PCT/FR 99/02051

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIH W ET AL: "AN ADENOVIRAL VECTOR SYSTEM FOR FUNCTIONAL IDENTIFICATION OF NUCLEAR RECEPTOR LIGANDS" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 5, no. 2, 1 February 1991 (1991-02-01), pages 300-309, XP000386396	1-3
Y	abstract	4-19
X	WO 98 37185 A (HU SHI XUE ;UNIV TEXAS (US); XU HONG JI (US); ZHOU YUNLI (US); LOG) 27 August 1998 (1998-08-27)	20-33
Y	claim 29	4-19
X	BRASELMANN S ET AL: "A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 90, no. 5, 1 March 1993 (1993-03-01), pages 1657-1661, XP002104567	34
Y	figure 5	4-19
Y	WO 97 31108 A (ASS POUR LE DEV DE LA RECH ;BROCARD JACQUES BERTRAND (FR); CHAMBON) 28 August 1997 (1997-08-28)	4-19
	claim 14	
Y	WO 97 38117 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI ;EVANS ROLAND M (US); NO DAVID (US)) 16 October 1997 (1997-10-16)	4-19
	figure 2	
Y	DANIELIAN P ET AL: "Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen." MOL. ENDOCRINOL., vol. 7, no. 2, February 1993 (1993-02), pages 232-240, XP002104568	4-19
	abstract	
Y	WILSON J: "A pharmacologic rheostat for gene therapy" NAT MED, vol. 2, no. 9, September 1996 (1996-09), pages 977-978, XP002129577	4-19
	the whole document	
	---	
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 99/02051

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUKUNAGA B ET AL: "Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 270, no. 48, 8 December 1995 (1995-12-08), pages 29270-29278, XP002129578 ---	
A	EP 0 316 717 A (DAIICHI SEIYAKU CO) 24 May 1989 (1989-05-24) ---	
A	WO 97 44475 A (LUSKY MONIKA ;MEHTALI MAJID (FR); LEROY PIERRE (FR); TRANSGENE SA) 27 November 1997 (1997-11-27) ---	
A	WO 96 30512 A (BRACCO LAURENT ;TOCQUE BRUNO (FR); RHONE POULENC RORER SA (FR); SC) 3 October 1996 (1996-10-03) ---	
A	OLIGINO T ET AL: "Drug inducible transgene expression in brain using a herpes simplex virus vector" GENE THERAPY, vol. 5, no. 4, April 1998 (1998-04), page 491-496 XP002104570 -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02051

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/02051

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1-4, 6-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Inducible expression system comprising nucleotide sequences coding for a transcriptional activator and a recombinant adenoviral vector comprising a gene of interest placed under the control of an inducible promoter capable of being activated by said transcriptional activator, said system being characterised in that said transcriptional activator is GRdex; recombinant adenoviral vector comprising the nucleotide sequences coding for a transcriptional activator placed under the control of regulating elements suited for their expression and a gene of interest placed under the control of an inducible promoter capable of being activated by said transcriptional activator; said adenoviral vector being characterised in that said nucleotide sequences code for said transcriptional activator; infectious viral particle, method for preparing said particle, eukaryotic cell comprising said expression system, pharmaceutical composition, and use of said system.

2. Claims: 1-4, 6-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Identical to subject 1, but said transcriptional activator being ER-T.

3. Claims: 1-4, 6-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Identical to subject 1, but said transcriptional activator comprising a first polypeptide including an ecdysone receptor DLL derivative, a DNA binding domain derived from EcR and GR receptors, and a transactivation domain derived from the VP16 viral protein, and a second polypeptide derived from the USP protein of drosophile or of a homologue.

4. Claims: 1-4, 6-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Identical to subject 1, but said transcriptional activator comprising a first polypeptide including a DNA binding domain derived from ZFHD1 and a DLL derived from FKBP12 and a second polypeptide including a transactivation domain derived from p65 and a DLL derived from FRAP.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/02051

5. Claims: 1-4, 6-33 ( all partly, inasmuch as applicable)

Identical to subject 1, but said transcriptional activator comprising a first polypeptide derived from AhR and a second polypeptide derived from Arnt.

6. Claims: 20-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Recombinant adenoviral vector comprising all the nucleotide sequences coding for a transcriptional activator placed under the control of regulating elements suited for their expression and a gene of interest placed under the control of an inducible promoter capable of being activated by said transcriptional activator; said vector being characterised in that said nucleotide sequences code for the tTA polypeptide; infectious viral particle, method for preparing said particle, eukaryotic cell comprising said expression system, pharmaceutical composition, and use of said system.

7. Claims 5, 34 (wholly) and 1-4, 6-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Identical to subject 1, but said transcriptional activator comprising a DLL and a transactivation domain derived from a steroid receptor and a heterologous DNA binding domain in particular derived from the Gal4 yeast protein.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/FR 99/02051

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9837185 A	27-08-1998	NONE	
WO 9731108 A	28-08-1997	FR 2745008 A AU 707684 B AU 2098997 A CA 2247517 A EP 0896620 A	22-08-1997 15-07-1999 10-09-1997 28-08-1997 17-02-1999
WO 9738117 A	16-10-1997	AU 2557297 A CA 2251466 A CN 1215432 A EP 0910652 A	29-10-1997 16-10-1997 28-04-1999 28-04-1999
EP 0316717 A	24-05-1989	AT 101198 T CA 1309044 A DE 3887635 D DE 3887635 T ES 2061604 T JP 2000466 A JP 2826114 B US 5646013 A US 5534419 A	15-02-1994 20-10-1992 17-03-1994 01-06-1994 16-12-1994 05-01-1990 18-11-1998 08-07-1997 09-07-1996
WO 9744475 A	27-11-1997	FR 2748753 A AU 3036197 A	21-11-1997 09-12-1997
WO 9630512 A	03-10-1996	FR 2732348 A AU 5402096 A BR 9607928 A CA 2214451 A CZ 9703080 A EP 0817845 A HU 9801221 A JP 11503011 T NO 974449 A SK 131197 A ZA 9602506 A	04-10-1996 16-10-1996 09-06-1998 03-10-1996 14-01-1998 14-01-1998 28-08-1998 23-03-1999 26-09-1997 06-05-1998 01-10-1996

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No  
PCT/FR 99/02051

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 C12N15/861 C12N15/62 C12N5/10 A61K48/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NARUMI K ET AL: "Intermittent, repetitive corticosteroid-induced upregulation of platelet levels after adenovirus-mediated transfer to the liver of a chimeric glucocorticoid-responsive promoter controlling the thrombopoietin cDNA" BL000, vol. 92, no. 3, 1 août 1998 (1998-08-01), pages 822-833, XP002104566	1-3
Y	abrégé --- -/--	4-19
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  2 février 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  22. 02. 00
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Lonnoy, O

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième édition) (juillet 1992)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCT/FR 99/02051

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SHIH W ET AL: "AN ADENOVIRAL VECTOR SYSTEM FOR FUNCTIONAL IDENTIFICATION OF NUCLEAR RECEPTOR LIGANDS" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 5, no. 2, 1 février 1991 (1991-02-01), pages 300-309, XP000386396	1-3
Y	abrégé	4-19
X	WO 98 37185 A (HU SHI XUE ;UNIV TEXAS (US); XU HONG JI (US); ZHOU YUNLI (US); LOG) 27 août 1998 (1998-08-27)	20-33
Y	revendication 29	4-19
X	BRASELMANN S ET AL: "A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 90, no. 5, 1 mars 1993 (1993-03-01), pages 1657-1661, XP002104567	34
Y	figure 5	4-19
Y	WO 97 31108 A (ASS POUR LE DEV DE LA RECH ;BROCARD JACQUES BERTRAND (FR); CHAMBON) 28 août 1997 (1997-08-28)	4-19
Y	revendication 14	
Y	WO 97 38117 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI ;EVANS ROLAND M (US); NO DAVID (US)) 16 octobre 1997 (1997-10-16)	4-19
Y	figure 2	
Y	DANIELIAN P ET AL: "Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen." MOL. ENDOCRINOL., vol. 7, no. 2, février 1993 (1993-02), pages 232-240, XP002104568	4-19
Y	abrégé	
Y	WILSON J: "A pharmacologic rheostat for gene therapy" NAT MED, vol. 2, no. 9, septembre 1996 (1996-09), pages 977-978, XP002129577	4-19
	le document en entier	
	---	
	-/--	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. te Internationale No

PC./FR 99/02051

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FUKUNAGA B ET AL: "Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 270, no. 48, 8 décembre 1995 (1995-12-08), pages 29270-29278, XP002129578 ----	
A	EP 0 316 717 A (DAIICHI SEIYAKU CO). 24 mai 1989 (1989-05-24) ----	
A	WO 97 44475 A (LUSKY MONIKA ;MEHTALI MAJID (FR); LEROY PIERRE (FR); TRANSGENE SA) 27 novembre 1997 (1997-11-27) ----	
A	WO 96 30512 A (BRACCO LAURENT ;TOCQUE BRUNO (FR); RHONE POULENC RORER SA (FR); SC) 3 octobre 1996 (1996-10-03) ----	
A	OLIGINO T ET AL: "Drug inducible transgene expression in brain using a herpes simplex virus vector" GENE THERAPY, vol. 5, no. 4, avril 1998 (1998-04), page 491-496 XP002104570 -----	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

La demande internationale n°  
PCT/FR 99/02051

## **Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## **Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Système d'expression inductible comprenant les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel et un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé par ledit activateur transcriptionnel, ledit système caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel est GRdex; vecteur adénoviral recombinant comprenant les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriées à leur expression et un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé par ledit activateur transcriptionnel; ledit vecteur adénoviral caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques codent pour ledit activateur transcriptionnel; particule virale infectieuse, procédé de préparation de ladite particule, cellule eucaryote comprenant ledit système d'expression, composition pharmaceutique, et utilisation dudit système.

2. revendications: 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Identique au sujet 1, mais ledit activateur transcriptionnel étant ER-T.

3. revendications: 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Identique au sujet 1, mais ledit activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un DLL dérivé du récepteur à l'ecdysone, un domaine de liaison à l'ADN hybride dérivé de ceux des récepteurs EcR and GR, et un domaine de transactivation dérivé de la protéine virale VP16, et un second polypeptide dérivé de la protéine USP de drosophile ou d'un homologue.

4. revendications: 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Identique au sujet 1, mais ledit activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un domaine de

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

liaison à l'ADN dérivé de ZFHD1 et un DLL dérivé de FKBP12, et un second polypeptide comportant un domaine de transactivation dérivé de p65 et un DLL dérivé de FRAP.

5. revendications: 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Identique au sujet 1, mais ledit activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide dérivé de AhR et un second polypeptide dérivé de Arnt.

6. revendications: 20-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Vecteur adénoviral recombinant comprenant les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriées à leur expression et un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé par ledit activateur transcriptionnel; ledit vecteur caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques codent pour le polypeptide tTA; particule virale infectieuse, procédé de préparation de ladite particule, cellule eucaryote comprenant ledit système d'expression, composition pharmaceutique, et utilisation dudit système.

7. revendications: 5, 34 (totalement) et 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Identique au sujet 1, mais ledit activateur transcriptionnel comprenant un DLL et un domaine de transactivation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN hétérologue notamment dérivé de la protéine de levure Gal4.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs membres de familles de brevets

Demande internationale No

PC 1 / FR 99/02051

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9837185 A	27-08-1998	AUCUN	
WO 9731108 A	28-08-1997	FR 2745008 A AU 707684 B AU 2098997 A CA 2247517 A EP 0896620 A	22-08-1997 15-07-1999 10-09-1997 28-08-1997 17-02-1999
WO 9738117 A	16-10-1997	AU 2557297 A CA 2251466 A CN 1215432 A EP 0910652 A	29-10-1997 16-10-1997 28-04-1999 28-04-1999
EP 0316717 A	24-05-1989	AT 101198 T CA 1309044 A DE 3887635 D DE 3887635 T ES 2061604 T JP 2000466 A JP 2826114 B US 5646013 A US 5534419 A	15-02-1994 20-10-1992 17-03-1994 01-06-1994 16-12-1994 05-01-1990 18-11-1998 08-07-1997 09-07-1996
WO 9744475 A	27-11-1997	FR 2748753 A AU 3036197 A	21-11-1997 09-12-1997
WO 9630512 A	03-10-1996	FR 2732348 A AU 5402096 A BR 9607928 A CA 2214451 A CZ 9703080 A EP 0817845 A HU 9801221 A JP 11503011 T NO 974449 A SK 131197 A ZA 9602506 A	04-10-1996 16-10-1996 09-06-1998 03-10-1996 14-01-1998 14-01-1998 28-08-1998 23-03-1999 26-09-1997 06-05-1998 01-10-1996

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

VERSION CORRIGÉE

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
9 mars 2000 (09.03.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 00/12741 A3

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>:  
C12N 15/861, 15/62, 5/10, A61K 48/00

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): TRANS-  
GENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Stras-  
bourg (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR99/02051

(72) Inventeurs; et

(22) Date de dépôt international: 27 août 1999 (27.08.1999)

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): MEHTALI,  
Majid [FR/FR]; 16, Impasse de Reims, F-67400 Illkirch-  
Graffenstaden (FR). SORG-GUSS, Tania [FR/FR]; 3, Im-  
passe du Ruisseau, F-67330 Dossenheim sur Zinsel (FR).

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet  
Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

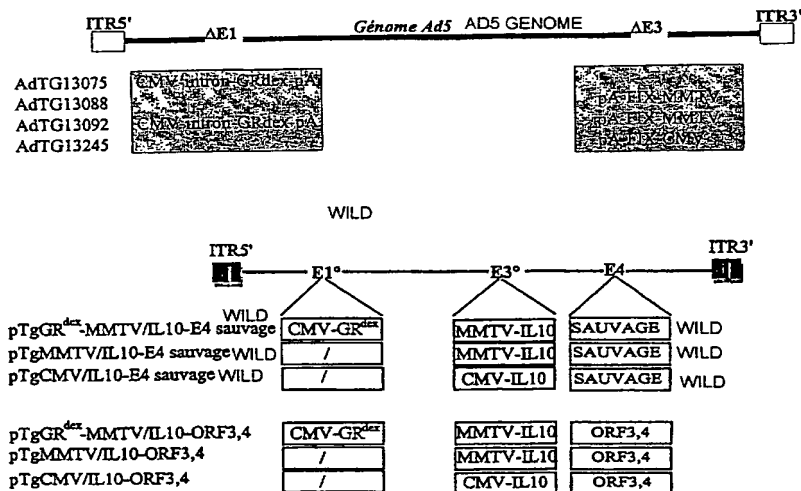
(30) Données relatives à la priorité:  
98/10842 28 août 1998 (28.08.1998) FR

(81) États désignés (national): AU, CA, JP, US.

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: INDUCIBLE EXPRESSION SYSTEM

(54) Titre: SYSTEME D'EXPRESSION INDUCTIBLE



(57) Abstract: The invention concerns an inducible expression system using nucleotide sequences coding for a transcriptional activator of eukaryotic or viral origin and a recombinant adenoviral vector comprising a gene of interest placed under the control of a promoter inducible *in trans* by said transcriptional activator. The invention also concerns a recombinant adenoviral vector bearing a first expression cassette coding for a transcriptional activator and a second cassette bearing a gene of interest placed under the control of a promoter inducible *in trans* by said transcriptional activator. The invention further concerns an infectious viral particle, its preparation method, a eukaryotic cell and a pharmaceutical composition comprising such a vector or expression system as well as their use for therapeutic or prophylactic purposes.

[Suite sur la page suivante]

WO 00/12741 A3



(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(48) Date de publication de la présente version corrigée:  
29 mars 2001

(15) Renseignements relatifs à la correction:  
voir la Gazette du PCT n° 13/2001 du 29 mars 2001, Section II

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:  
4 mai 2000

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

---

(57) Abrégé: La présente invention concerne un système d'expression inductible mettant en oeuvre les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel d'origine eucaryote ou virale et un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur transcriptionnel. Elle a également pour objet un vecteur adénoviral recombinant portant une première cassette d'expression codant pour un activateur transcriptionnel et une seconde cassette portant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur transcriptionnel. L'invention a également trait à une particule virale infectieuse, son procédé de préparation, une cellule eucaryote et une composition pharmaceutique comprenant un tel vecteur ou système d'expression ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques ou prophylactiques.

## SYSTEME D'EXPRESSION INDUCTIBLE

La présente invention concerne un système d'expression inductible mettant  
5 en oeuvre les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel  
et un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le  
contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur transcriptionnel  
sous une forme activée. Elle a également pour objet un vecteur adénoviral  
10 recombinant portant une première cassette d'expression codant pour ledit  
activateur transcriptionnel et une seconde cassette portant un gène d'intérêt placé  
sous le contrôle d'un promoteur inductible *en trans* par ledit activateur  
transcriptionnel. L'invention a également pour objet une particule virale  
infectieuse, une cellule, une composition pharmaceutique comprenant un tel  
15 vecteur ou système d'expression ainsi que leur utilisation à des fins thérapeutiques  
ou prophylactiques. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des  
perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

La thérapie génique se définit comme le transfert d'information génétique  
dans une cellule ou un organisme hôte. Le premier protocole appliqué à l'homme  
a été initié aux Etats Unis en septembre 1990 sur un patient génétiquement  
20 immunodéficient en raison d'une mutation affectant le gène codant pour l'Adénine  
Désaminase (ADA). Il s'agissait de corriger ou remplacer le gène défectueux dont  
le dysfonctionnement est à l'origine d'une maladie génétique par un gène  
fonctionnel. Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le  
développement de cette technologie qui a été depuis étendue au traitement d'autres  
25 maladies aussi bien génétiques qu'acquises (cancers, maladies infectieuses comme  
le SIDA...) dans le but de délivrer *in situ* des gènes thérapeutiques améliorant la  
pathologie. La plupart des stratégies utilisent des vecteurs pour véhiculer le gène  
thérapeutique vers sa cible cellulaire. De nombreux vecteurs tant viraux que  
synthétiques ont été développés au cours de ces dernières années et ont fait l'objet

de nombreuses publications accessibles à l'homme du métier.

L'intérêt des adénovirus à titre de vecteurs de thérapie génique a déjà été évoqué dans de nombreux documents de l'art antérieur. Ils infectent de nombreux types cellulaires, aussi bien des cellules en division que quiescentes, sont non  
5 intégratifs et peu pathogènes. En outre, ils possèdent un tropisme naturel pour les voies respiratoires. Ces propriétés particulières font des adénovirus des vecteurs de choix pour de nombreuses applications thérapeutiques et même vaccinales. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une molécule d'ADN linéaire et bicaténaire d'environ 36 kb qui porte une trentaine de gènes intervenant dans le  
10 cycle viral. Les gènes précoces (E1 à E4 ; E pour early en anglais) sont répartis en 4 régions dispersées dans le génome. Les régions E1, E2 et E4 sont essentielles à la réplication virale alors que la région E3 impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire anti-adénovirus chez l'hôte ne l'est pas. Les gènes tardifs (L1 à L5 ; L pour late signifiant tardif en anglais) codent majoritairement pour les  
15 protéines de structure et recouvrent en partie les unités de transcription précoces. Ils sont pour la plupart transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (pour Major Late Promoter en anglais). En outre, le génome adénoviral porte à ses extrémités des régions agissant *en cis* essentielles à l'encapsidation constituées de séquences terminales inversées (ITR) situées aux extrémités 5' et 3' et d'une région  
20 d'encapsidation qui suit l'ITR 5'.

Les vecteurs adénoviraux actuellement utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont dépourvus de la majeure partie de la région E1 afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. Des délétions supplémentaires dans la région E3 permettent d'accroître les capacités de clonage.  
25 Les gènes d'intérêt sont introduits dans l'ADN viral à la place de l'une ou l'autre région déletée. Cependant, l'immunogénécité potentielle des protéines virales encore exprimées peut dans certaines applications particulières s'opposer à la persistance des cellules transduites et à l'expression stable du transgène. Ces inconvénients ont justifié la construction de vecteurs de nouvelles générations qui

conservent les régions *en cis* (ITRs et séquences d'encapsidation) essentielles à l'encapsidation mais comportent des modifications génétiques supplémentaires visant à supprimer l'expression *in vivo* de la plupart des gènes viraux (voir par exemple la demande internationale WO94/28152). A cet égard, un vecteur dît  
5 minimal, déficient pour l'ensemble des fonctions adénovirales représente une alternative de choix.

La plupart des vecteurs développés à l'heure actuelle sont basés sur une expression constitutive du transgène. Or il peut être souhaitable de limiter l'expression du gène thérapeutique à un nombre restreint de types cellulaires.  
10 L'expression tissu-spécifique peut être médiée par le biais de promoteurs et d'enhancers tissu-spécifiques ou de systèmes d'expression inductibles répondant à un événement cellulaire ou temporel spécifique.

De nombreux systèmes d'expression inductibles proposés actuellement reposent sur l'emploi de promoteurs régulés par des facteurs de transcription  
15 endogènes activés par un ligand inducteur particulier (hormones stéroïdes, interféron, métaux lourds...). Un premier inconvénient est que ces systèmes nécessitent la présence des facteurs activateurs endogènes au sein de la cellule cible. De plus, le niveau d'expression basal est souvent élevé en raison d'une activation «bruit du fond» due aux substances cellulaires endogènes, qui peut  
20 générer des effets secondaires non négligeables.

Un certain nombre de systèmes d'expression basés sur l'utilisation de facteurs procaryotiques ont été mis en évidence au cours de ces dernières années. On peut citer par exemple ceux des opérons bactériens tétracycline (Gossen et Bujard, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547-5551), lactose (Miller et  
25 Reznikoff (Eds), The operons, Cold Spring Harbor Laboratory), tryptophane (Yanofsky et al., 1981, Nucleic acids Res. 9, 6647-6668), de la protéine 16 du virus simplex de l'herpès (protéine *trans*-activatrice VP16), ou de la protéine Gal4 de levure (Webster et al., 1988, Cell 52, 169-178).

D'une manière générale, l'opéron de résistance à la tétracycline est codé par

le transposon Tn10 (Hillen et al., 1984, J. Mol. Biol. 172, 185-201). La régulation est assurée par une courte séquence nucléotidique dite "opérateur" (tet O) qui constitue un site de fixation de divers régulateurs. Ainsi, la fixation du répresseur tétracycline (tet R) ou de l'antibiotique tétracycline diminue considérablement le niveau de transcription. Au contraire, un effet d'activation est obtenu en mettant en oeuvre une protéine, désignée dans la littérature "trans-activateur tétracycline (tTA)" qui résulte de la fusion entre le tet R et les 130 acides aminés C-terminaux du domaine d'activation de la protéine VP16 du virus simplex de l'herpès. L'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de plusieurs copies de tet O en amont de séquences de base de la transcription (TATA box, site d'initiation de la transcription...) est détectable par co-expression du tTA et inhibée par ajout de tétracycline. La Tétracycline lie le tTA et empêche ainsi la transcription. Ce système est fonctionnel dans un contexte vecteur rétroviral (Paulus et al., 1996, J. Virol. 70, 62-67) et adénoviral (Neering et al., 1996, Blood 4, 1147-1155 ; Yoshida and Hamada, 1997, Biochem. Biophys. Comm. 230, 426-430 ; Massie et al., 1998, J. Virol. 72, 2289-2296). Dans ce dernier cas, le trans-activateur est fourni *en trans* soit par infection d'une lignée établie exprimant le tTA par un vecteur adénoviral contenant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'éléments *tetO* et du promoteur CMV soit par co-infection des cellules par deux vecteurs adénoviraux, l'un contenant la cassette d'intérêt et l'autre exprimant le tTA. Un système reverse dans lequel l'expression du transgène est activée en présence de la tétracycline, a été développé en mutant la protéine de fusion tTA (Gossen et al., 1995, Science 268, 1766-1769). La protéine modifiée rtTA ne lie en effet les éléments *tetO* qu'en présence de tétracycline. Une autre variante selon laquelle l'expression est contrôlée à deux niveaux (en absence de tétracycline et en présence d'oestradiol), est obtenue en fusionnant le tTA au domaine de liaison au ligand du récepteur aux oestrogènes (Iida et al., 1996, J. Virol. 70, 6054-6059).

Un autre système inductible repose sur l'emploi de récepteurs endogènes afin de remédier à l'immunogénicité potentielle des trans-activateurs

procaryotiques. A cet égard, les récepteurs des hormones stéroïdes ont fait l'objet de nombreuses publications. On peut citer plus particulièrement les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) (Israël et Kaufman, 1989, *Nucleic Acids Res.* 17, 4589-4604), à la progestérone (PR) (Gronemeyer et al., 1987, *EMBO J.* 6, 3985-3994) et aux oestrogènes (ER) (Klein-Hitpaß et al., 1986, *Cell* 46, 1053-1061 ; Koike et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15, 2499-2513). Leur mode d'action est variable puisqu'ils sont capables de trans-activer ou de trans-réprimer la transcription selon la cellule cible, le ligand hormonal et les éléments de régulation employés. Pour ce qui est de la trans-activation, le récepteur stéroïdien est sous sa forme inactive complexé à divers facteurs cellulaires dont certaines protéines de choc thermique (hsp pour heat shock protein en anglais). La fixation d'un ligand agoniste (hormone stéroïde) entraîne un changement de la conformation du récepteur. Cette activation s'accompagne de la dissociation des facteurs cellulaires, d'une translocation nucléaire et augmente la capacité du récepteur à fixer une courte séquence d'ADN spécifique (séquence cible), ce qui permet l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle et l'induction de la transcription. Pour remplir leur fonction, ces récepteurs sont généralement organisés en 3 domaines fonctionnels, respectivement un domaine de trans-activation permettant l'activation de la transcription, un domaine de liaison à l'ADN (séquence cible) et un domaine de liaison au ligand (DLL).

Des récepteurs modifiés répondant préférentiellement à des ligands synthétiques non naturels sont également proposés dans la littérature. Par exemple, Wang et al. (1994, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 8180-8184) ont construit une chimère activable par la molécule RU486 mais pas par la progestérone endogène, qui résulte de la fusion du domaine de liaison au ligand du récepteur tronqué de la progestérone ( $\Delta$ PR), du domaine de liaison à l'ADN de la protéine de levure Gal4 et du domaine de trans-activation de la protéine VP16. Toutefois, l'activité basale reste élevée et la protéine chimère peut potentiellement interférer avec les facteurs transcriptionnels cellulaires. Des variants des récepteurs ER et GR modifiés dans

leurs domaines de liaison au ligand ont également été décrits. Ainsi, le mutant ER<sup>T</sup> obtenu par substitution de la glycine en position 521 du récepteur ER par une arginine, est incapable de fixer les oestrogènes endogènes, mais peut être activé par des ligands synthétiques tel que le Tamoxifène, pour activer la transcription régulée  
5 par la séquence cible ERE (pour estrogen responsive element). Un variant analogue a également été construit pour le récepteur GR, modifié en position 747 par substitution de l'isoleucine par une thréonine (Roux et al., 1996, Molecular Endocrinology 10, 1214-1226). Ce variant désigné GR<sup>dx</sup> est incapable de fixer les glucocorticoïdes endogènes, mais peut être activé par des ligands synthétiques tels  
10 que la Dexaméthasone. Une fois activé, il reconnaît la séquence cible GRE (pour glucocorticoïde responsive element ; Cato et al., 1986, EMBO J. 5, 2237-2240) et stimule la transcription du promoteur qui lui est associé.

Un autre système d'expression inductible utilise le récepteur stéroïdien d'insecte répondant à l'ecdysone (EcR). Le récepteur est activé par l'ecdysone et  
15 forme un hétérodimère avec la protéine ultraspiracle (USP) de la Drosophile qui se fixe à une séquence cible spécifique (EcRE pour ecdysone responsive element) pour activer la transcription. No et al. (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3346-3351) ont créé un récepteur mutant VgEcR obtenu par fusion du DLL du récepteur EcR, d'un hybride entre le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs  
20 EcR et GR et du domaine de *trans*-activation de VP16. Le mutant peut former, en présence de l'ecdysone ou de son analogue muristone A, un hétérodimère avec la protéine USP ou son homologue humain, le récepteur de l'acide rétinoïque X (RXR), et activer la transcription de gènes placés sous le contrôle d'une séquence hybride (5xE/GRE) comprenant les motifs répondant aux récepteurs EcR et GR.  
25 Un tel système évite une éventuelle activation endogène.

Un autre système d'expression inductible décrit dans la littérature met en oeuvre les immunophilines. Rivera et al. (1996, Nat. Med. 2, 1028-1032) ont développé un système à deux composantes assemblées en présence d'un ligand. Plus précisément, la première composante est une fusion entre le facteur de

transcription ZFHD1 (portant un domaine de liaison à l'ADN) et l'immunophiline FKBP12 et la deuxième composante est une fusion entre le domaine de trans-activation du facteur NF $\kappa$ B p65 et FRAP (FKBP12-rapamycine-associated protein). Le trans-activateur est activé sous forme d'un hétérodimère associant les  
5 deux composantes et la rapamycine liant les portions FKBP12 et FRAP qui peut induire l'expression d'un transgène placé sous le contrôle des éléments-cibles de ZFHD1.

Enfin, Dolwick et al. (1993, Mol. Pharmacol. 44, 911-917) ont identifié le récepteur aryl hydrocarbon (AhR) impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques  
10 et des substances chimiques élaborées par l'homme. L'AhR, sous forme inactive est complexé à divers facteurs cellulaires dont la protéine chaperonne hsp90. La fixation d'un ligand xénobiotique induit la dissociation du complexe, la translocation du AhR dans le noyau, la formation d'un hétérodimère avec la protéine Arnt (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ; Hoffman et al.,  
15 1991, Science 252, 954-958). La fixation de l'hétérodimère sur les éléments cibles de l'ADN nommés XRE (pour xenobiotique responsive elements) induit la transcription des séquences géniques en aval. La séquence XRE est présente dans la région promotrice de nombreux gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme de drogues, telles que glutathione-S-transférase ou cytochrome  
20 P4501A1. AhR et Arnt possèdent un domaine responsable de la reconnaissance de la séquence cible, de l'hétérodimérisation et de la liaison au ligand. La majorité des études de trans-activation par le biais du complexe AhR/Arnt utilise le ligand 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD)

La présente invention propose un système d'expression inductible mettant  
25 en oeuvre un vecteur adénoviral comportant un gène d'intérêt dont l'expression est régulée par un trans-activateur activable par l'apport de molécules pharmacologiques exogènes. Ce système est basé plus particulièrement sur l'utilisation d'un récepteur stéroïdien. Une fois activé, le complexe récepteur/ligand va se fixer sur sa séquence cible et permettre une activation *en trans* de

l'expression du gène thérapeutique. On a maintenant construit un vecteur adénoviral recombinant contenant, en remplacement de la région E1, une cassette d'expression du récepteur stéroïdien mutant GR<sup>dex</sup> exprimé de façon constitutive par le promoteur précoce du cytomégalo virus (CMV) et, en remplacement de la

5 région E3, une cassette d'expression du gène facteur IX (FIX) humain placé en aval du promoteur du virus MMTV (mouse mammary tumor virus) contenant la séquence cible GRE. Les expériences qui suivent montrent la fonctionnalité d'un tel système inductible *in vitro* et *in vivo*. De façon analogue, le récepteur ER<sup>T</sup> a également été inséré dans la région E1 d'un adénovirus sous le contrôle du

10 promoteur CMV. Dans ce cas, la cassette inductible du gène FIX est régulée par la séquence ERE associée au promoteur minimal du gène TK (thymidine kinase) de HSV (herpès simplex virus). Le troisième système étudié dans le cadre de la présente invention met en oeuvre le récepteur modifié VgEcR et le récepteur humain RXR dont les séquences ont été introduites dans la région E1 d'un

15 adénovirus. La cassette inductible présente dans la région E3 place l'ADNc du FIX sous le contrôle des éléments hybrides 5xE/GRE.

La finalité de la présente invention est de remédier aux inconvénients des vecteurs de thérapie génique actuels, en améliorant notamment la spécificité (activation par des substances exogènes non toxiques et non par des facteurs

20 cellulaires endogènes) et l'inductibilité (activité basale en l'absence d'inducteur minimale et forte expression du transgène à l'état activé). L'objet de la présente invention peut être appliqué à divers protocoles de thérapie génique nécessitant l'expression de molécules solubles, telles que des molécules antitumorales (anticorps, cytokines, chimiokines) ou dans tous les cas où l'expression du gène

25 thérapeutique devra être régulée en fonction des besoins de l'organisme. Il permet également l'analyse des gènes dont l'expression est cytotoxique ou réduite à certaines étapes du développement.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un système d'expression

inductible comprenant :

(i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel d'origine eucaryote ou virale et placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte , et

(ii) un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

Aux fins de la présente invention, le terme «activateur transcriptionnel» définit un polypeptide ou un ensemble de polypeptides exerçant une action positive sur la transcription c'est à dire ayant la capacité d'initier ou de stimuler la transcription d'un gène quelconque à partir d'éléments de régulation appropriés répondant audit activateur transcriptionnel. L'effet positif sur la transcription est de préférence médié directement par la liaison de l'activateur aux éléments de régulation mais peut l'être indirectement par l'intermédiaire de facteur(s) cellulaire(s). De préférence, on a recours à un activateur transcriptionnel ligand-dépendant apte à lier une séquence d'ADN caractéristique (séquence cible) et à activer le promoteur qui lui est associé. De tels activateurs transcriptionnels sont décrits dans l'état de la technique. On indique également que dans le cadre de la présente invention, l'activateur transcriptionnel peut être un polypeptide unique sous forme de monomère ou de multimère (de préférence dimère) ou encore peut résulter de l'association d'un ensemble de polypeptides formant un hétéromère (de préférence un ensemble de deux polypeptides formant un hétérodimère). L'activateur transcriptionnel en usage dans la présente invention peut être dérivé d'un organisme quelconque d'origine eucaryote ou virale, notamment d'une levure, d'un insecte, d'un vertébré ou d'un virus ou peut avoir une origine mixte c'est à dire être formé de composantes d'origines diverses.

Un activateur transcriptionnel convenant à la mise en oeuvre de la présente invention comprend au moins 3 types de domaines fonctionnels, respectivement un

domaine de trans-activation, un domaine de liaison à l'ADN (séquence cible) et un domaine de liaison au ligand (DLL). Dans le cadre de la présente invention, l'ordre des différents domaines est sans importance. De plus, ils peuvent être répartis dans la séquence en acides aminés de manière continue ou discontinue (avec éventuellement un chevauchement des résidus impliqués dans chaque fonction) et localisés sur un ou les polypeptide(s) formant ledit activateur transcriptionnel. Par ailleurs, il peut comprendre plusieurs domaines d'un même type. Un exemple adéquate est constitué par l'hétérodimère développé par Rivera et al. (1996, Nat. Med. 2, 1028-1032) activé par la liaison de la rapamycine aux portions FKBP12 et FRAP.

Le terme «domaine de liaison au ligand» fait référence à la portion de l'activateur transcriptionnel qui interagit avec un ligand-inducteur approprié. L'interaction DLL-inducteur place l'activateur transcriptionnel en état activé, étape nécessaire à l'activation transcriptionnelle. Le DLL est de préférence localisé à l'extrémité C-terminale du ou d'un polypeptide composant ledit activateur transcriptionnel.

Le terme «domaine de liaison à l'ADN» fait référence à la portion de l'activateur transcriptionnel qui interagit avec la séquence d'ADN cible présente au sein du promoteur inductible contrôlant l'expression du gène d'intérêt et spécifique de l'activateur transcriptionnel choisi. Ladite séquence cible est généralement placée en amont d'une région promotrice contenant au moins une TATA box et est composée de motifs reconnus par l'activateur transcriptionnel. Ces motifs peuvent former une structure particulière (palindrome, répétitions en orientation sens ou inversée ...etc). Les séquences cibles adaptées à chaque activateur transcriptionnel sont décrites dans la littérature. Pour illustrer, on peut citer :

- la séquence cible GRE (pour glucocorticoid responsive element) comportant un motif TGTCT (ou son complémentaire) reconnu par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur GR ou d'un

analogue (GR<sup>dex</sup>). Un exemple préféré est constitué par la séquence 5'GGTACANNNTGTTCT3' où N représente un nucléotide quelconque ;

- 5        - la séquence cible ERE (pour oestrogen responsive element) comportant un motif 5'AGGTCA3' (ou son complémentaire) reconnu par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur ER ou d'un analogue (ER<sup>T</sup>). Un exemple préféré est constitué par la séquence 5'AGGTCANNNTGACC3' où N représente un nucléotide quelconque ;
- 10       - la séquence cible UAS (pour upstream activating sequence) de séquence 5' CCGAGTACTGTCCTCCG3' (ou son complémentaire) reconnue par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur Gal 4 de levure ou d'un analogue ;
- 15       - la séquence cible EcRE (pour ecdysone responsive element) comportant un motif GACAAG (ou son complémentaire) reconnu par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur EcR ou d'un analogue. Un exemple préféré est constitué par la séquence 5'GACAAGGGTTCAATGCACTTGTC3' ;
- 20       - la séquence 5xE/GRE de séquence 5'AGGTCANAGAACA3' (ou son complémentaire) reconnue par un domaine de liaison à l'ADN hybride entre EcR et GR ou d'un analogue,
- 25       - la séquence cible 5' TAATTANGGGNG3' où N représente un nucléotide quelconque, reconnue par le facteur de transcription ZFHD1
- 25       - la séquence cible XRE (pour xenobiotique responsive element) de séquence 5'CCTCCAGGCTTCTTCTCACGCAACTCC3' reconnue par un domaine de liaison à l'ADN dérivé du récepteur AhR ou d'un analogue.

Le terme «domaine de trans-activation» fait référence à la portion de l'activateur transcriptionnel qui interagit avec la machinerie cellulaire pour initier ou stimuler la transcription génique dépendante de la séquence cible répondant audit activateur. Ce domaine peut être issu d'un facteur de transcription classique (NF $\kappa$ B, SP-1...) ou d'un facteur ligand-dépendant (récepteur stéroïdien, immunophiline, AhR...). Un domaine comprenant les 130 acides aminés C-terminaux de VP16 convient tout particulièrement.

La trans-activation induite par l'activateur transcriptionnel en usage dans le cadre de la présente invention peut être vérifiée simplement par des techniques conventionnelles, par exemple en suivant l'expression d'un gène donné placé sous le contrôle de la séquence cible adéquate ou la synthèse de son produit d'expression (analyse selon Northern, Western, immunofluorescence...etc) en présence du récepteur activé par l'inducteur. Un protocole détaillé est donné dans les exemples ci-après. Une différence d'un facteur d'au moins 2, avantageusement d'au moins 5 et, de préférence, d'au moins 10 reflète la capacité de trans-activation du système d'expression selon l'invention.

On peut illustrer ces définitions par l'exemple du récepteur GR. Son domaine de trans-activation est localisé dans la partie N-terminale entre les résidus 272 et 400 (Jonat et al., 1990, Cell 62, 1189-1204), le domaine de liaison à l'ADN de 66 acides aminés entre les résidus 421 et 487 (Lucibello et al., 1990, EMBO J. 9, 2827-2834) et le domaine de liaison au ligand hormonal d'environ 300 acides aminés dans la partie C-terminale (Kerpolla et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13, 3782-3791). Ce dernier domaine comprend également les séquences responsables pour la dimérisation du GR, sa localisation nucléaire et l'interaction avec les protéines hsp. La trans-activation est médiée par la liaison d'un dimère de récepteur à la séquence cible GRE.

Avantageusement, l'activateur transcriptionnel inclu dans le système d'expression inductible selon l'invention comporte tout ou partie d'un domaine dérivé d'un récepteur d'hormones stéroïdes choisi parmi le groupe constitué par

les récepteurs oestrogène (ER), glucocorticoïde (GR), progestérone (PR), Vitamine D, ecdysone (EcR), minéralocorticoïde, androgène, hormone thyroïde, acide rétinoïque et acide rétinoïque X ou encore d'une immunophiline ou d'un récepteur aryl hydrocarbon (AhR).

5 Dans le cadre de la présente invention, on peut mettre en oeuvre un récepteur modifié. Avantageusement, le récepteur modifié a perdu sa capacité d'activation par un inducteur naturel et acquis une capacité d'activation par un inducteur non naturel et retient la capacité de trans-activation du récepteur natif. L'homme de l'art connaît la ou les modifications à effectuer à cet égard. Elles  
10 peuvent être diverses (délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs résidus du récepteur naturel) et concerner un ou plusieurs domaines. De manière préférée, le domaine fonctionnel modifié présente une identité de séquence avec son équivalent natif d'au moins 70 %, avantageusement d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 % et, de manière tout à fait préférée d'au moins 95%.

15 Selon un premier mode de réalisation, on a recours à un récepteur modifié dans son DLL de manière à être activable par un inducteur non naturel. Des exemples préférés sont constitués par les mutants GR<sup>dex</sup> (I747T) et ER<sup>T</sup> (G521R) déjà cités.

On peut également envisager de mettre en oeuvre un activateur  
20 transcriptionnel chimère comprenant des polypeptides ou fragments polypeptidiques variés. Avantageusement, il résulte de la fusion ou de l'association de domaines fonctionnels d'origines différentes. En effet, il est possible d'échanger les domaines fonctionnels entre les différents récepteurs et toutes les combinaisons possibles entrent dans le cadre de la présente invention. Par exemple, pour réduire  
25 l'interférence avec les complexes récepteurs / ligands endogènes, on peut envisager de remplacer le domaine de liaison à l'ADN d'un récepteur stéroïdien par celui d'un récepteur non humain (d'origine virale ou animale ou d'eucaryote inférieur), par exemple un récepteur stéroïdien animal, un récepteur de levure (Gal4)... la

seule condition étant d'adapter la séquence cible au domaine de liaison à l'ADN retenu. Une telle adaptation est à la portée de l'homme de l'art. A titre indicatif, lorsque le domaine de liaison à l'ADN est issu de Gal4, le promoteur inductible mis en oeuvre contiendra les éléments UAS (Upstream Activating Sequences) 5 répondant à Gal4. Par ailleurs, le domaine de trans-activation peut être issu de n'importe quel domaine d'activation transcriptionnel connu, notamment de la protéine 16 du virus herpès simplex (VP16) ou de la p65 du facteur NF $\kappa$ B et en particulier, de son extrémité C-terminale. Un activateur transcriptionnel associant un DLL dérivé d'un récepteur stéroïdien, un domaine de trans-activation dérivé de 10 VP16 et un domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ou d'un récepteur stéroïdien convient à la mise en oeuvre de la présente invention. A cet égard, on utilisera de préférence les résidus 1 à 74 de Gal4. Mais d'autres combinaisons sont également envisageables.

Par ailleurs, on peut employer également un domaine fonctionnel hybride 15 entre des fragments polypeptidiques différents. Un exemple possible est constitué par un domaine de liaison à l'ADN hybride entre les récepteurs EcR et GR, reconnaissant une séquence cible hybride comportant les motifs répondant à l'ecdysone et aux glucocorticoïdes.

Un activateur transcriptionnel préféré dans le cadre de la présente invention 20 est choisi parmi :

- (i) un polypeptide désigné GR<sup>dex</sup> comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivés d'un récepteur aux glucocorticoïdes, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment par substitution de l'isoleucine en position 747 par une thréonine ;
- 25 (ii) un polypeptide désigné ER<sup>T</sup> comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivé d'un récepteur à l'oestrogène, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment par substitution de la glycine en position 521 par une arginine ;

- (iii) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un DLL dérivé du récepteur à l'ecdysone, un domaine de liaison à l'ADN hybride dérivé de ceux des récepteurs EcR et GR et un domaine de trans-activation dérivé de la protéine virale VP16 et un second polypeptide dérivé de la protéine USP de drosophile ou d'un homologue tel que le récepteur de l'acide rétinoïque X (RXR) humain ;
- (iv) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un domaine de liaison à l'ADN dérivé du facteur de transcription ZFHD1 et un DLL dérivé de l'immunophiline FKBP12 et un second polypeptide comportant un domaine de trans-activation dérivé du facteur NFκB p65 et un DLL dérivé de FRAP (FKBP12-rapamycine-associated protein) ; et
- (v) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide dérivé du récepteur AhR et un deuxième polypeptide dérivé de la protéine Arnt.
- De préférence, les activateurs transcriptionnels (i) et (ii) sont sous forme d'homodimères et (iii) (iv) et (v) sont sous forme d'hétérodimères associant le premier et le second polypeptide et, éventuellement, l'inducteur.

Selon un mode de réalisation tout à fait avantageux, l'activateur transcriptionnel est activé par liaison à un inducteur non naturel et n'est pas ou peu activé par un composé humain naturel.

Le terme «inducteur non naturel» se réfère à un composé qui n'est pas trouvé naturellement dans l'organisme humain ou animal à qui la thérapie utilisant le système d'expression inductible selon l'invention est destinée. Il s'agit de préférence d'un inducteur synthétique qui n'est pas trouvé naturellement dans un organisme humain et dont la structure est légèrement différente de celle d'un composé humain (endogène). Aux fins de la présente invention, un inducteur non naturel est capable d'activer l'activateur transcriptionnel en usage dans le cadre de la présente invention, en particulier par liaison au DLL, afin d'initier ou stimuler la transcription dépendante de la séquence cible répondant audit activateur. Le

choix d'un inducteur non naturel adapté à l'activateur transcriptionnel retenu est à la portée de l'homme de l'art sur la base de l'état de la technique. L'activation de l'activateur transcriptionnel par l'inducteur non naturel peut se faire par une interaction covalente ou non covalente (électrostatique, hydrophobe, liaison  
5 hydrogène ... etc). Par ailleurs, l'inducteur peut être constitué par un composé unique ou par un ensemble de molécules. Il appartient de préférence à la famille des stéroïdes, rétinoides, acides gras, vitamines, hormones, xénobiotiques ou antibiotiques.

Selon un mode de réalisation avantageux, ledit inducteur non naturel est  
10 une substance synthétique administrable par voie orale. De préférence, il est choisi parmi le groupe constitué par la dexaméthasone, le tamoxifène, le muristérone A, l'ecdysone, la rapamycine et le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) ou un analogue quelconque de ces composés, de préférence peu ou pas toxique.

Les séquences codant pour l'activateur transcriptionnel compris dans le  
15 système d'expression inductible selon l'invention sont placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés permettant l'expression dans une cellule ou un organisme hôte. Le terme «éléments de régulation appropriés» regroupent l'ensemble des éléments permettant la transcription desdites séquences en ARN et la traduction en protéine. Parmi ceux-ci, le promoteur revêt une importance  
20 particulière. Il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote, procaryote ou même virale. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène endogène. Par ailleurs, il peut être constitutif ou régulable. En outre, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription, rendre un promoteur constitutif régulable ou *vice*  
25 *versa*, introduire un site de restriction..... On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycérate Kinase), MT (metallothioneine ; Mc Ivor et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7, 838-848), le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus), le LTR du RSV (Rous Sarcoma Virus), le promoteur TK-HSV-1, le promoteur précoce du virus CMV (Cytomegalovirus)

et les promoteurs gouvernant l'expression des gènes adénoviraux tardifs (MLP) et précoces (E1A, E2A, E3 ou E4). Mais, il peut également être intéressant de réguler l'expression de l'activateur transcriptionnel. Selon une première variante, son expression peut être contrôlée par sa séquence cible spécifique (autoactivation et/ou activation par le récepteur sauvage endogène activé par le ligand endogène).  
5 Par exemple, on aura recours aux éléments ERE ou GRE pour l'expression d'un activateur transcriptionnel comportant un domaine de liaison à l'ADN dérivé de ER ou GR ( $ER^T$  ou  $GR^{dex}$ ). Une autre possibilité est l'emploi d'un promoteur régulable choisi parmi ceux de l'art antérieur. A cet égard, l'utilisation d'un  
10 promoteur stimulant l'expression dans une cellule tumorale ou cancéreuse peut être avantageuse. On peut citer notamment les promoteurs des gènes MUC-1 surexprimé dans les cancers du sein et de la prostate (Chen et al., 1995, J. Clin. Invest. 96, 2775-2782), CEA (pour carcinoma embryonic antigen) surexprimé dans les cancers du colon (Schrewe et al., 1990, Mol. Cell. Biol. 10, 2738-2748),  
15 tyrosinase surexprimé dans les mélanomes (Vile et al., 1993, Cancer Res. 53, 3860-3864), ERB-2 surexprimé dans les cancers du sein et du pancréas (Harris et al., 1994, Gene Therapy 1, 170-175) et  $\alpha$ -fétoprotéine surexprimée dans les cancers du foie (Kanai et al., 1997, Cancer Res. 57, 461-465). On indique que le promoteur précoce du Cytomégalo virus (CMV) est tout particulièrement préféré.  
20 Bien entendu, les éléments de régulation appropriés peuvent en outre comprendre des éléments additionnels améliorant l'expression (séquence intronique, séquence terminatrice de la transcription...) ou encore le maintien dans une cellule hôte. De tels éléments sont connus de l'homme de l'art.

Lorsque l'activateur transcriptionnel en usage dans le cadre de la présente  
25 invention est composé par un ensemble de polypeptides, ceux-ci peuvent être produits à partir de séquences nucléotidiques polycistroniques (placées sous le contrôle d'un promoteur unique) mettant en oeuvre un site d'initiation de la traduction de type IRES pour initier la traduction du second cistron. On peut également employer un promoteur bidirectionnel dirigeant l'expression de deux

gènes placés de part et d'autre. On peut aussi générer des cassettes d'expression indépendantes comportant chacune des éléments de régulation appropriés tels que ceux cités auparavant. Les cassettes peuvent être portées par un même vecteur d'expression ou par des vecteurs différents.

5 Les séquences employées dans le cadre de la présente invention peuvent être obtenues par les techniques classiques de biologie moléculaire, par exemple par criblage de banque à l'aide de sondes spécifiques, par immunocriblage de banque d'expression, par PCR au moyen d'amorces adéquates ou par synthèse chimique. Les mutants peuvent être générés à partir des séquences natives par  
10 substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotides en mettant en oeuvre les techniques de mutagenèse dirigée, de PCR, de digestion par les enzymes de restriction et ligation ou encore par synthèse chimique. La fonctionnalité des mutants et des constructions peut être vérifiée par les techniques de l'art.

La deuxième composante du système d'expression inductible selon  
15 l'invention est un vecteur adénoviral recombinant comportant au moins un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

On aura de préférence recours à un vecteur adénoviral dépourvu de tout ou partie d'au moins une région essentielle à la réplication sélectionnée parmi les  
20 régions E1, E2, E4 et L1 à L5, afin d'éviter sa propagation au sein de l'organisme hôte ou de l'environnement. Une délétion de la majorité de la région E1 est préférée. Avantagusement, elle s'étend des nt 454 à 3328 mais peut également englober des séquences additionnelles en 5' et 3' à la condition de ne pas interférer avec la fonction d'encapsidation. De préférence, le gène pIX n'est pas inclus dans  
25 la délétion de E1. En outre, elle peut être combinée à d'autres modification(s) touchant notamment les régions E2, E4 et/ou L1-L5, dans la mesure où les fonctions essentielles défectives sont complétées *en trans* au moyen d'une lignée de complémentation et/ou d'un virus auxiliaire. A cet égard, on peut avoir recours aux vecteurs de seconde génération défectifs pour les fonctions E1 et E4

ou E1 et E2 (voir par exemple les demandes internationales WO94/28152 et WO97/04119). Pour illustrer ce mode de réalisation, on peut citer un vecteur combinant une délétion au sein de la région E1 et une mutation thermosensible affectant le gène DBP (pour DNA Binding Protein en anglais) de la région E2A  
5 (Ensinger et al., 1972, *J. Virol.* 10, 328-339). Pour ce qui est de la région E4, elle peut être délétée en totalité ou en partie. Une délétion partielle de la région E4 à l'exception des séquences codant pour les cadres de lecture ouverts (ORF) 3 et/ou 6/7 est avantageuse dans la mesure où elle ne nécessite pas de complémentation de la fonction E4 (Ketner et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17, 3037-3048). Dans le  
10 but d'augmenter les capacités de clonage, le vecteur adénoviral recombinant peut en outre être dépourvu de tout ou partie de la région E3 non essentielle. Selon cette alternative, il peut être intéressant de conserver néanmoins les séquences E3 codant pour les polypeptides permettant l'échappement au système immunitaire de l'hôte, notamment la glycoprotéine gp19k (Gooding et al., 1990, *Critical Review*  
15 *of Immunology* 10, 53-71). Selon une autre alternative, on peut employer un vecteur adénoviral minimal retenant essentiellement les ITRs (Inverted Terminal Repeat) 5' et 3' et la région d'encapsidation et défectif pour l'ensemble des fonctions virales.

Par ailleurs, l'origine du vecteur adénoviral du système d'expression  
20 inductible selon l'invention, peut être variée aussi bien du point de vue de l'espèce que du sérotype. Il peut dériver du génome d'un adénovirus humain ou animal (canin, aviaire, bovin, murin, ovin, porcin, simien...) ou encore d'un hybride comprenant des fragments de génome adénoviral d'au moins deux origines différentes. On peut citer plus particulièrement les adénovirus CAV-1 ou CAV-2  
25 d'origine canine, DAV d'origine aviaire ou encore Bad de type 3 d'origine bovine (Zakharchuk et al., *Arch. Virol.*, 1993, 128: 171-176 ; Spibey et Cavanagh, *J. Gen. Virol.*, 1989, 70: 165-172 ; Jouvenne et al., *Gene*, 1987, 60: 21-28 ; Mittal et al., *J. Gen. Virol.*, 1995, 76: 93-102). Cependant, on préférera un vecteur adénoviral d'origine humaine dérivant de préférence d'un adénovirus de sérotype C,

notamment de type 2 ou 5.

Le gène d'intérêt en usage dans la présente invention, peut être issu d'un organisme eucaryote, d'un procaryote d'un parasite ou d'un virus autre qu'un adénovirus. Il peut être isolé par toute technique conventionnelle dans le domaine de l'art, par exemple par clonage, PCR ou synthèse chimique. Il peut être de type génomique (comportant tout ou partie de l'ensemble des introns), de type ADN complémentaire (ADNc, dépourvu d'intron) ou de type mixte (minigène). Par ailleurs, il peut coder pour un ARN antisens et/ou un ARN messenger (ARNm) qui sera ensuite traduit en polypeptide d'intérêt celui-ci pouvant être (i) intracellulaire, 10 (ii) incorporé dans la membrane de la cellule hôte ou (iii) sécrété. Il peut s'agir d'un polypeptide tel que trouvé dans la nature (natif), d'une portion de celui-ci (tronqué), d'un mutant présentant notamment des propriétés biologiques améliorées ou modifiées ou encore d'un polypeptide chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses. Par ailleurs, le gène d'intérêt peut coder pour un 15 ARN anti-sens, un ribozyme, ou encore un polypeptide d'intérêt.

Parmi les polypeptides d'intérêt utilisables, on peut citer plus particulièrement les chémokines et cytokines (interféron  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ , interleukine (IL), notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou encore l'IL-12, facteur nécrosant des tumeurs (TNF), facteur stimulateur de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...), 20 MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, protéine de chémoattraction des monocytes telle que MCP-1...), les récepteurs cellulaires (notamment reconnus par le virus HIV), les ligands de récepteur, les facteurs de coagulation (Facteur VIII, Facteur IX, thrombine, protéine C), les facteurs de croissance (FGF pour Fibroblast Growth Factor, VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor), les enzymes (uréase, 25 rénine, métalloprotéinase, nitric oxide synthétase NOS, SOD, catalase, lécithine cholestérol acyl transférase LCAT...), les inhibiteurs d'enzyme ( $\alpha$ 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteur de protéase virale, PAI-1 pour plasminogen activator inhibitor), les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II

- ou polypeptides agissant sur l'expression des gènes correspondants, les polypeptides capables d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement, les polypeptides agissant positivement ou négativement sur l'apoptose (Bax, Bcl2, BclX...), les agents cytostatiques (p21, p 16, Rb), les
- 5 immunoglobulines en totalité ou en partie (Fab, ScFv...), les toxines, les immunotoxines, les apolipoprotéines (ApoAI, ApoAIV, ApoE...), les inhibiteurs d'angiogénèse (angiostatine, endostatine...), les marqueurs ( $\beta$ -galactosidase, luciférase...) ou tout autre polypeptide ayant un effet thérapeutique pour l'affection ciblée.
- 10 Plus précisément, dans le but de traiter un dysfonctionnement héréditaire, on utilisera une copie fonctionnelle du gène défectueux, par exemple un gène codant pour le facteur VIII ou IX dans le cadre de l'hémophilie A ou B, la dystrophine (ou minidystrophine) dans le cadre des myopathies de Duchenne et Becker, l'insuline dans le cadre du diabète, la protéine CFTR (Cystic Fibrosis
- 15 Transmembrane Conductance Regulator) dans le cadre de la mucoviscidose. S'agissant d'inhiber l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers, on mettra de préférence en oeuvre un gène d'intérêt codant pour un ARN anti-sens, un ribozyme, un produit cytotoxique (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique, produit des gènes de levure
- 20 *FCYI* et *FURI* codant pour l'uracyle phosphoribosyl transférase et la cytosine désaminase.....), une immunoglobuline, un inhibiteur de la division cellulaire ou des signaux de transduction, un produit d'expression d'un gène suppresseur de tumeur (p53, Rb, p73, DCC....), un polypeptide stimulateur du système immunitaire, un antigène associé à une tumeur (MUC-1, BRCA-1, antigènes précoces ou tardifs
- 25 (E6, E7, L1, L2...) d'un virus à papillome HPV....), éventuellement en combinaison avec un gène de cytokine. Enfin, dans le cadre d'une thérapie anti-HIV, on peut avoir recours à un gène codant pour un polypeptide immunoprotecteur, un épitope antigénique, un anticorps (2F5; Buchacher et al., 1992, Vaccines 92, 191-195), le domaine extracellulaire du récepteur CD4 (sCD4 ; Trauneker et al., 1988, Nature

331, 84-86) une immunoadhésine (par exemple un hybride CD4-immunoglobuline IgG ; Capon et al., 1989, Nature 337, 525-531 ; Byrn et al., 1990, Nature 344, 667-670), une immunotoxine (par exemple fusion de l'anticorps 2F5 ou de l'immunoadhésine CD4-2F5 à l'angiogénine ; Kurachi et al., 1985, Biochemistry 24, 5494-5499), un variant trans-dominant (EP 0614980, WO95/16780), un produit cytotoxique tel que l'un de ceux mentionné ci-dessus ou encore un IFN $\alpha$  ou  $\beta$ .

Un des gènes d'intérêt peut également être un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées ou transduites. On peut citer les gènes *neo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une  
10 résistance à l'antibiotique G418, *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), *pac* (Puromycine Acétyl-Transférase) ou encore *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase). D'une manière générale, les gènes de sélection sont connus de l'homme de l'art.

Par ailleurs, la cassette d'expression du gène d'intérêt peut, en outre,  
15 inclure des éléments additionnels améliorant son expression ou son maintien dans la cellule hôte (origines de réplication, éléments d'intégration dans le génome cellulaire, séquences introniques, séquences poly A de terminaison de la transcription, leaders tripartites...). Ces éléments sont connus de l'homme de l'art. En outre, le gène d'intérêt peut également comporter en amont de la région  
20 codante une séquence codant pour un peptide signal permettant sa sécrétion de la cellule hôte. Le peptide signal peut être celui du gène en question ou hétérologue (issu d'un gène quelconque sécrété ou synthétique).

La cassette d'expression du gène d'intérêt peut être insérée à un endroit quelconque du génome adénoviral. Avantageusement, elle est introduite en  
25 remplacement de la région E3. Lorsque le vecteur adénoviral recombinant comporte plusieurs gènes d'intérêt, ceux-ci peuvent être placés sous le contrôle des mêmes éléments génétiques (cassette polycistronique utilisant un site interne d'initiation de la traduction de type IRES pour réinitier la traduction du second cistron) ou d'éléments indépendants. Dans ce cas, ils peuvent être insérés dans une

même région adénovirale (par exemple en remplacement de E3) ou dans des régions différentes (par exemple en remplacement de E3 et d'une autre région délétée).

Dans le cadre de la présente invention, l'expression du gène d'intérêt est contrôlée par un promoteur inductible par un activateur transcriptionnel tel que défini ci-avant. Au sens de la présente invention, un promoteur inductible comprend au moins une séquence cible répondant à l'activateur transcriptionnel mis en oeuvre et associée de manière opérationnelle à un promoteur minimal. Les séquences cibles ont été définies auparavant et sont décrites dans la littérature accessible à l'homme de l'art (pour rappel, ERE, GRE, EcRE, UAS, 5xE/GRE, XRE...). On indique que l'on peut employer une séquence homologue modifiée par rapport à la séquence native mais exerçant une fonction de régulation similaire ou améliorée. Ces modifications peuvent résulter de l'addition, de la délétion et/ou de la substitution d'un ou plusieurs nucléotides ou de fusion entre deux séquences cibles différentes. On peut mettre en oeuvre une ou plusieurs séquences cibles, par exemple de 1 à 25, avantageusement de 1 à 10 et, de préférence, de 1 à 7, éventuellement placées en tandem et dans une orientation quelconque par rapport à la TATA box. Elle(s) est (sont) généralement insérée(s) dans le promoteur inductible en amont du promoteur minimal, jusqu'à plusieurs centaines de paires de bases de celui-ci. Un exemple de promoteur inductible par un activateur transcriptionnel dérivé du GR, est le LTR du virus MMTV (mouse mammary tumor virus) qui contient l'élément GRE et des séquences promotrices adéquates.

Un promoteur minimal comprend essentiellement une TATA box et un site d'initiation de la transcription fonctionnels dans une cellule ou un organisme hôte. Ces éléments sont classiques dans le domaine de l'art concerné. On peut citer plus particulièrement les promoteurs minimaux des gènes TK, CMV et HSP (promoteur minimal du gène de protéine de choc thermique de drosophile dépourvu de l'enhancer).

En outre, le promoteur inductible en usage dans le cadre de la présente

invention peut comporter des éléments supplémentaires améliorant le niveau de transcription ou le limitant à certains tissus particuliers (de type enhancer). Ces éléments supplémentaires peuvent de manière alternative être insérés dans une région génique non codante.

- 5            Selon un premier mode de réalisation, les séquences nucléotidiques codant pour l'activateur transcriptionnel et leurs éléments de régulation sont portées par le vecteur adénoviral recombinant du système d'expression selon l'invention. Les cassettes d'expression du gène d'intérêt et de l'activateur transcriptionnel peuvent être localisées dans la même région du génome adénoviral ou en des endroits  
10 différents et en orientation sens ou anti-sens l'une par rapport à l'autre. L'orientation anti-sens est préférée. Un exemple préféré est fourni par un vecteur E1<sup>-</sup> E3<sup>-</sup> dans lequel chacune des cassettes est insérée à la place des séquences adénovirales déléetées.

- Selon une autre variante, les séquences nucléotidiques sont portées par un  
15 vecteur d'expression indépendant autre que le vecteur adénoviral recombinant en usage dans le système d'expression selon l'invention. Il peut s'agir d'un vecteur synthétique (lipides cationiques, liposomes polymères ...), d'un plasmide ou encore d'un vecteur viral. Il peut être éventuellement associé à une ou plusieurs substances améliorant l'efficacité transfectionnelle et/ou la stabilité du vecteur. Ces substances  
20 sont largement documentées dans la littérature accessible à l'homme de l'art (voir par exemple Felgner et al., 1987, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115-121 ; Hodgson et Solaiman , 1996, Nature Biotechnology 14, 339-342 ; Remy et al., 1994, Bioconjugate Chemistry 5, 647-654). A titre illustratif mais non limitatif, il peut s'agir de polymères, de lipides notamment cationiques, de liposomes, de  
25 protéines nucléaires ou encore de lipides neutres. Ces substances peuvent être utilisées seules ou en combinaison. Une combinaison envisageable est un vecteur recombinant plasmidique associé à des lipides cationiques (DOGS, DC-CHOL, spermine-chol, spermidine-chol etc...) et des lipides neutres (DOPE).

Le choix des plasmides utilisables dans le cadre de la présente invention est

vaste. Il peut s'agir de vecteurs de clonage et/ou d'expression. D'une manière générale, ils sont connus de l'homme de l'art et nombre d'entre eux sont disponibles commercialement mais il est également possible de les construire ou les modifier par les techniques de manipulation génétique. On peut citer à titre  
5 d'exemples les plasmides dérivés de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagène), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) ou encore p Poly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201). De préférence, un plasmide mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention contient une origine de replication assurant l'initiation de la replication dans une cellule productrice et/ou une cellule hôte (par  
10 exemple, on retiendra l'origine ColE1 pour un plasmide destiné à être produit dans *E. coli* et le système oriP/EBNA1 si l'on désire qu'il soit autoreplicatif dans une cellule hôte mammifère, Lupton et Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542 ; Yates et al., Nature 313, 812-815). Il peut en outre comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées  
15 (complémentation d'une mutation d'auxotrophie, gène codant pour la résistance à un antibiotique...). Bien entendu, il peut comprendre des éléments supplémentaires améliorant son maintien et/ou sa stabilité dans une cellule donnée (séquence *cer* qui favorise le maintien monomérique d'un plasmide (Summers et Sherrat, 1984, Cell 36, 1097-1103, séquences d'intégration dans le génome cellulaire).

20 S'agissant d'un vecteur viral, on peut envisager un vecteur dérivant d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus associé à l'adénovirus (AAV), d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus, d'un parvovirus, d'un poxvirus (fowlpox, canaripox, virus de la vaccine notamment de la souche MVA (Modified Virus Ankara) ou Copenhagen... etc) ou d'un foamyvirus. On aura de préférence recours à un  
25 vecteur non réplcatif et, éventuellement, non intégratif.

Les rétrovirus ont la propriété d'infecter et de s'intégrer majoritairement dans les cellules en division et à cet égard sont particulièrement appropriés pour l'application cancer. Un vecteur rétroviral convenant à la mise en oeuvre de la présente invention comporte les séquences terminales LTR, une région

d'encapsidation et les séquences nucléotidiques codant pour l'activateur transcriptionnel dont l'expression est contrôlée par le promoteur rétroviral (dans le LTR 5') ou par un promoteur interne tel que cité ci-dessus. Il peut dériver d'un rétrovirus d'une origine quelconque (murin, primate, félin, humain etc...) et en particulier du MoMuLV (Moloney murine leukemia virus), MVS (Murine sarcoma virus) ou Friend murine retrovirus (Fb29). Il est propagé dans une lignée d'encapsidation capable de fournir *en trans* les polypeptides viraux gag, pol et/ou env nécessaires à la constitution d'une particule virale. De telles lignées sont décrites dans la littérature (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 etc...). Le vecteur rétroviral selon l'invention peut comporter des modifications notamment au niveau des LTRs (remplacement de la région promotrice par un promoteur eucaryote) ou de la région d'encapsidation (remplacement par une région d'encapsidation hétérologue, par exemple de type VL30) (voir les demandes françaises 94 08300 et 97 05203).

Un vecteur adénoviral convient tout particulièrement pour l'expression de l'activateur transcriptionnel envisagé dans le cadre de la présente invention. On aura de préférence recours à un vecteur déficient ayant l'une des caractéristiques précitées. En particulier, les vecteurs adénoviraux recombinant (portant la cassette d'expression inductible du gène d'intérêt) et indépendant (portant la cassette d'expression de l'activateur transcriptionnel) sont de préférence tous deux déficients pour la fonction E1 par délétion de tout ou partie de la région E1 ou mutation non fonctionnelle. Le cas échéant, l'un ou l'autre ou les deux peuvent être en outre déficient(s) pour au moins l'une des fonctions E2, E4, L1, L2, L3, L4 et/ou L5. De même, une délétion de tout ou partie de la région E3 peut être envisagée pour l'un ou les deux vecteurs.

Selon un mode de réalisation avantageux, les vecteurs viraux (vecteur adénoviral recombinant et, le cas échéant, ledit vecteur viral indépendant) faisant partie du système d'expression selon l'invention peuvent être sous la forme de vecteur ADN ou de particule virale infectieuse.

La présente invention concerne également un vecteur adénoviral recombinant comprenant

- (i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte, et
- (ii) un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

Le vecteur adénoviral recombinant selon l'invention peut coder pour un activateur transcriptionnel ayant les caractéristiques définies auparavant qui, sous forme activé par un inducteur tel que décrit précédemment, a la capacité d'initier ou d'activer la transcription d'un gène contrôlé par un promoteur inductible comprenant une séquence cible spécifique dudit activateur transcriptionnel telle que décrite ci-dessus.

De manière alternative, le vecteur adénoviral recombinant selon l'invention peut coder pour un activateur transcriptionnel procaryotique et, notamment, un polypeptide comprenant un DLL et un domaine de liaison à l'ADN dérivé d'un répresseur de l'opéron tétracycline (tetR) et un domaine d'activation de la transcription quelconque. Il s'agit de préférence du polypeptide désigné dans la littérature «trans-activateur tétracycline» tTA (Gossen et Bujard, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547-5551) dans lequel le tetR isolé du transposon Tn10 est fusionné en phase aux 130 acides aminés C-terminaux de la protéine virale VP16. Dans ce cas, on mettra en oeuvre un inducteur non naturel activant le tTA, tel que la doxycycline, la tétracycline ou un analogue agoniste. Bien entendu, les caractéristiques de la cassette d'expression inductible du gène d'intérêt sont les mêmes que précédemment, mis à part la présence d'une ou plusieurs séquence(s) cible(s) répondant à l'activateur transcriptionnel procaryotique. S'agissant de tTA, la séquence cible est constituée par l'opérateur tétracycline (tetO). Dans le cadre de la présente invention, on préfère tout particulièrement la combinaison "tet O - promoteur minimal" donnant lieu à un promoteur dont le niveau de base de la

transcription est naturellement très faible mais activable par l'inducteur tTA et répressible par la tétracycline.

Il n'est pas nécessaire de revenir sur le squelette du vecteur adénoviral recombinant selon l'invention dans la mesure où il répond aux caractéristiques déjà  
5 mentionnées.

La présente invention concerne également une particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention.

Les techniques de préparation des vecteurs adénoviraux sont largement documentées dans la littérature. Dans un premier temps, le génome est reconstitué  
10 par recombinaison homologue dans la lignée 293 (voir notamment Graham et Preveet, 1991, Methods in Molecular Biology, Vol 7, Gene Transfer and Expression Protocols ; Ed E. J. Murray, The Human Press Inc, Clinton, NJ) ou dans *Escherichia coli* (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810 ; WO96/17070). Il est ensuite nécessaire de propager le vecteur afin de constituer  
15 un stock de particules virales le contenant. On utilise à cet effet des lignées de complémentation fournissant *en trans* les produits d'expression viraux pour lesquels le vecteur est defectif. Par exemple, les virus délétés de E1 peuvent être propagés dans la lignée 293, établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72). Pour ce qui est des  
20 vecteurs de seconde génération, on peut avoir recours à des lignées complémentant deux fonctions virales essentielles, telles que celles décrites par Yeh et al. (1996, J. Virol. 70, 559-565), Krougliak et Graham (1995, Human Gene Therapy 6, 1575-1586), Wang et al. (1995 Gene Therapy 2, 775-783), Lusky et al. (1998, J. Virol. 72, 2022-2033) et dans les demandes internationales WO94/28152 et  
25 WO97/04119. Une autre alternative repose sur l'emploi d'un élément viral supplémentaire, désigné "virus auxiliaire" pour compléter au moins en partie les fonctions défectives d'un vecteur adénoviral recombinant. Les virus auxiliaires de l'art antérieur consistent en un génome adénoviral, éventuellement délété d'une région essentielle pour laquelle le vecteur recombinant ne nécessite pas de

complémentation.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule virale, selon lequel :

- 5 (i) on introduit un vecteur adénoviral recombinant selon l'invention dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule de complémentation transfectée,
- (ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite  
10 particule virale, et
- (iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

Bien entendu, la particule virale peut être récupérée du surnageant de culture mais également des cellules. Une des méthodes couramment employée  
15 consiste à lyser les cellules par des cycles consécutifs de congélation/décongélation pour recueillir les virions dans le surnageant de lyse. Ceux-ci peuvent être amplifiés et purifiés selon les techniques de l'art (procédé chromatographique, ultracentrifugation notamment à travers un gradient de chlorure de césium...).

La présente invention concerne également une cellule eucaryote comprenant un système d'expression inductible, un vecteur adénoviral recombinant  
20 selon l'invention ou infectée par une particule virale selon l'invention. Aux fins de la présente invention, une telle cellule est constituée par toute cellule transfectable par un vecteur ou infectable par une particule virale, tels que définis ci-avant. Une cellule de mammifère et notamment humaine convient tout particulièrement. Il peut  
25 s'agir d'une cellule primaire ou tumorale d'une origine quelconque, notamment hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte ou macrophage...), musculaire (cellule satellite, myocyte, myoblaste, muscle lisse...), cardiaque, pulmonaire, trachéale, hépatique, épithéliale ou fibroblaste.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique un système d'expression inductible, un vecteur adénoviral

recombinant, une particule virale ou une cellule hôte selon l'invention en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Une composition selon l'invention est plus particulièrement destinée au traitement préventif ou curatif de maladies par thérapie génique (y compris immunothérapie) et s'adresse plus particulièrement aux maladies prolifératives (cancers, tumeurs, dysplasies...etc), aux maladies infectieuses et notamment virales (induites par les virus de l'hépatite B ou C, le HIV, l'herpès, les rétrovirus....etc), aux maladies génétiques (mucoviscidose, myopathies, hémophilie, diabète...) et aux maladies cardiovasculaires (resténose, ischémie, dislipidémie...).

10 Une composition selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle en vue d'une administration par voie locale, parentérale ou digestive. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent thérapeutique ou prophylactique à un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Les voies d'administration envisageables sont multiples. On peut  
15 citer par exemple la voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intraartérielle, intrapéritonéale, intratumorale, intranasale, intrapulmonaire ou intratrachéale. Pour ces trois derniers modes de réalisation, une administration par aérosol ou instillation est avantageuse. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois  
20 après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et les doses de virus appropriées varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu, de la pathologie, du gène d'intérêt à transférer, de la voie d'administration. A titre indicatif, les préparations à base de particules virales peuvent être formulées sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  ufp (unités formant des plages),  
25 avantageusement  $10^5$  et  $10^{13}$  ufp et, de préférence,  $10^6$  et  $10^{12}$  ufp. Lorsque l'on met en oeuvre un ou des vecteur(s), des doses comprenant de 0,01 à 100 mg d'ADN, de préférence 0,05 à 10 mg et, de manière tout à fait préférée, 0,5 à 5 mg peuvent être envisagées.

La formulation peut également inclure un diluant, un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique, de même que des agents de solubilisation, de stabilisation, de préservation. Une composition préférée est sous forme injectable. Elle peut être formulée en solution aqueuse, saline (phosphate, monosodique, disodique, magnésium, potassium....) ou isotonique. Elle peut être présentée en dose unique ou en multidoses sous forme liquide ou sèche (poudre, lyophilisat...) susceptible d'être reconstituée de manière extemporanée par un diluant approprié.

La présente invention est également relative à l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'un système d'expression inductible, d'un vecteur adénoviral recombinant, d'une particule virale ou d'une cellule hôte selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au transfert et à l'expression dudit gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte et, en particulier, au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol, dans le système vasculaire au moyen d'une sonde appropriée...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires...), de les transfecter ou infecter *in vitro* selon les techniques de l'art et de les réadministrer au patient après une étape d'amplification éventuelle. La prévention et le traitement de nombreuses pathologies peuvent être envisagés. Une utilisation préférée consiste à traiter ou prévenir les cancers, tumeurs et maladies résultant d'une prolifération cellulaire non désirée. Parmi les applications envisageables, on peut citer les cancers du sein, de l'utérus (notamment ceux induits par les papillomas virus), de la prostate, du poumon, de la vessie, du foie, du colon, du pancréas, de l'estomac, de l'oesophage, du larynx du système nerveux central et du sang (lymphomes, leucémie etc...). Elle est également utile dans le cadre des maladies cardiovasculaires, par exemple pour inhiber ou retarder la

prolifération des cellules de muscles lisses de la paroi vasculaire (resténose). Enfin pour ce qui est des maladies infectieuses, l'application au SIDA peut être envisagée.

L'invention s'étend également à une méthode pour le traitement des  
5 maladies par thérapie génique, caractérisée en ce que l'on administre à un organisme ou à une cellule hôte ayant besoin d'un tel traitement un système d'expression inductible, un vecteur adénoviral recombinant, une particule virale ou une cellule hôte selon l'invention.

Enfin, l'invention concerne également un activateur transcriptionnel  
10 comprenant un DLL et un domaine de trans-activation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, notamment dérivé de la protéine de levure Gal4. Un tel activateur transcriptionnel est obtenu en échangeant par les techniques de biologie moléculaire le domaine de liaison à l'ADN du récepteur stéroïdien par celui de Gal4 (en particulier porté par les résidus 1 à 74).  
15 Un hybride ER<sup>T</sup> ou GR<sup>dex</sup> et Gal4 est tout à fait préféré.

On indique que l'ensemble des dénominations utilisées dans la présente demande sont conventionnelles dans le domaine de l'art et que la portée inclut aussi les équivalents fonctionnels, c'est à dire tout polypeptide, domaine, gène, composé obtenu par modification d'un polypeptide, domaine, gène, composé natif  
20 et présentant une activité de même nature, voire sensiblement augmentée.

La Figure 1 est une représentation schématique de la quantité de FIX produite 144 h après transfection transitoire des cellules 293 par les plasmides pTG13064 (CMV-GR<sup>dex</sup>), pTG6242 (LTR MMTV-FIX, sens) et pTG13063 (LTR  
25 MMTV-FIX, anti-sens).

La Figure 2 : Evaluation de l'effet Dose / Réponse Dexaméthasone dans des cellules A549. L'infection des cellules est réalisée avec une MOI = 50 avec AdTG13092 ou AdTG13088. L'induction par la dexaméthasone est réalisée en

faisant varier la concentration de  $10^{-9}$  à  $10^{-7}$ M.

La Figure 3 : Représentation schématique des constructions AdTG13075, AdTG13088, AdTG13092 et AdTG13245.

La Figure 4 (a, b, c et d) : Evaluation *in vivo* du système inductible Grdex / Dexaméthasone avec les différentes constructions testées dans les souris C57B1/6. Les valeurs présentées sont les moyennes des valeurs mesurées dans chacune des souris traitées.

La Figure 5 (a, b, c et d) : Evaluation *in vivo* du système inductible Grdex / Dexaméthasone avec les différentes constructions testées dans les souris SCID. Les valeurs présentées sont les moyennes des valeurs mesurées dans chacune des souris traitées.

La Figure 6 : Evaluation d'un effet Dose / Réponse Dexaméthasone *in vivo* dans des souris SCID.

La Figure 7 : Représentation schématique de vecteurs adénoviraux dérivant du plasmide pTg6401 de première et de deuxième générations.

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples suivants.

### EXEMPLES

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ou une édition plus récente) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de clonage sont réalisées dans les souches *E. coli* 5K (hsdR, mcrA), DH5 $\alpha$  [(recA1, endA1, hodR17 (r-m-), supE44 thi-1, gyrA (nalr)] ou NM522 (supE, thi,  $\Delta$ (lac-proAB),  $\Delta$ hsd5, (r-m-), (F' proAB, lacI<sup>q</sup>, ZAM15) et celles de recombinaison homologue dans la souche *E. coli* BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la

réparation des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow, Boehringer Mannheim). Les fragments d'ADN sont purifiés à l'aide du kit de purification d'ADN GeneCleanII<sup>R</sup> (Bio101Inc.). Par  
5 ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, on a recours aux lignées  
10 cellulaires 293 (Graham et al, 1977, *supra* ; disponible à l'ATCC sous la référence CRL1573), A549 E1+ (WO94/28152), A549 (ATCC CCL-185) et Vero (ATCC CCL-81). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C en atmosphère humide enrichie à 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL)  
15 complémenté avec 1 mM de glutamine, 1% d'acides aminés (Gibco BRL), 40µg/l de gentamycine et 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco BRL). La transfection et la transduction des cellules est réalisée selon les techniques de l'art (précipitation au phosphate de calcium...)

20 **EXEMPLE 1 : Construction d'un vecteur adénoviral co-exprimant l'activateur transcriptionnel ER<sup>T</sup> et le gène FIX régulé par les séquences ERE.**

L'ADNc du gène sauvage ER est contenu dans le plasmide pSG1-HEO  
25 (Tora et al., 1989, EMBO J. 8, 1981-1989). Le domaine de liaison aux oestrogènes du récepteur ER (fragment *Bam*HI-*Xba*I) est remplacé par celui du mutant ER<sup>T</sup> (G521R) porté par le fragment *Not*I-*Xba*I de pCre-ER<sup>T</sup> (Feil et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10887-10890). Les séquences ER<sup>T</sup> sont insérées dans le

site *EcoRI* du vecteur de transfert pTG6600. A titre indicatif, pTG6600 est un vecteur p polyII (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201) dans lequel sont insérées les séquences Ad5 1 à 458, le promoteur précoce CMV, les séquences d'épissage hybrides trouvées dans le plasmide pCI (Promega Corp, comprenant le site

5 donneur d'épissage de l'intron 1 du gène  $\beta$ -globine humaine et le site accepteur d'épissage du gène d'immunoglobuline de souris), les séquences de polyadénylation du virus SV40 et les séquences Ad5 3328-5788. Une telle construction est à la portée de l'homme de l'art. Le vecteur ainsi obtenu pTG6237 contient la cassette d'expression CMV-ER<sup>T</sup> présente dans la région E1. La

10 construction finale désignée pTG6246 est reconstituée par recombinaison homologue (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805-4810) entre le fragment *PacI*-*Bst* EII isolé du vecteur précédent et pTG4656 linéarisé par *ClaI*. Ce dernier est un plasmide adénoviral E1<sup>-</sup> E3<sup>-</sup> contenant dans E1 le gène LacZ sous le contrôle du promoteur MLP (décrit dans la demande FR97 06757). Ainsi le génome

15 adénoviral porté par pTG6246 comprend la cassette CMV-ER<sup>T</sup> dans la région E1 et est délété de la région E3.

L'ADNc du FIX humain (Anson et al, 1984, EMBO J. 3, 1053-1060) est cloné sous forme d'un fragment *Bam*HI isolé d'un plasmide de l'art antérieur (par exemple décrit dans le brevet 88 14635) et inséré en aval du promoteur minimal

20 TK-HSV précédé de la séquence ERE (Klein-Hitpass et al., 1986, Cell 46, 1053-1061). La cassette est introduite dans le site *Bgl*II de pTG4664 en orientation sens et antisens (donnant respectivement pTG13227 et pTG13228). Le plasmide pTG4664 comprend les nucléotides 25838 à 320004 de l'Ad5 délétés des nucléotides 27871 à 30748 de la région E3. Une recombinaison homologue avec

25 le plasmide pTG6401 digéré par *Sfr*I (comportant le génome Ad5 délété des régions E1 et E3) permet de générer les vecteurs adénoviraux E1<sup>-</sup> E3<sup>-</sup> portant la cassette inductible ERE/TKp-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3. La construction sens (correspondant au sens de transcription de E3) est dénommée

pTG13235 et la construction anti-sens pTG13236.

Les vecteurs doublement recombinants contenant les cassettes d'expression CMV-ER<sup>T</sup> et ERE/TKp-FIX à la place des régions E1 et E3 respectivement sont générés par recombinaison homologue entre les fragments portant la cassette  
5 inductible FIX isolés des vecteurs pTG13227 et pTG13228 et le vecteur pTG6246. On obtient pTG13233 et pTG13234 selon l'orientation de la cassette inductible.

**EXEMPLE 2 : Construction d'un vecteur adénoviral co-exprimant  
l'activateur transcriptionnel GR<sup>dex</sup> et le gène FIX régulé par  
les séquences GRE.**  
10

L'ADNc du récepteur GR<sup>dex</sup> porté par le fragment *EcoRI* (2,7Kb) du plasmide pHG1 (Kumar et al., 1987, Cell 51, 941-951) est cloné dans le site *EcoRI* du vecteur pTG6600, pour donner pTG13064. Le vecteur adénoviral pTG13075  
15 contenant la cassette d'expression CMVp-GR<sup>dex</sup> en remplacement de la région E1 et délété de la majorité de la région E3 est obtenu par recombinaison homologue entre le fragment *PacI-Bst* EII isolé du vecteur précédent et pTG4656 linéarisé par *Clal*.

Le fragment *Bam*HI contenant l'ADNc du FIX humain est inséré en aval  
20 du LTR de MMTV contenant la séquence GRE (Cato et al., 1986, EMBO J. 5, 2237-2240). La cassette est ensuite introduite en orientation sens et antisens dans le site *Bgl*II de pTG4664 bordant les séquences E3 délétées. Les vecteurs de transfert sont désignés pTG6242 (sens) et pTG13063 (anti-sens). Une recombinaison homologue avec le plasmide pTG6401 digéré par *Sfr*I (comportant  
25 le génome adénoviral délété des régions E1 et E3) permet de générer les vecteurs adénoviraux E1<sup>+</sup> E3<sup>-</sup> portant la cassette inductible LTR MMTV-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3. La construction sens (identique au sens de transcription de E3) est dénommée pTG13082 et la construction anti-sens

pTG13088.

Une recombinaison homologue avec le plasmide pTG13075 permet de générer les vecteurs adénoviraux E1' E3' portant la cassette inductible LTR MMTV-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3 et la cassette CMV-GR<sup>dex</sup> dans la région E1. La construction sens (identique au sens de transcription de E3) est dénommée pTG13083 et la construction anti-sens pTG13092 (sens de transcription inverse pour les cassettes FIX et GR<sup>dex</sup>).

**EXEMPLE 3 : Construction d'un vecteur adénoviral co-exprimant l'activateur transcriptionnel VgEcR et le gène FIX régulé par les séquences 5xE/GRE.**

Le plasmide pVgRXR (In Vitrogen) comprend les deux sous-unités composant l'activateur transcriptionnel activable par l'ecdysone ou son analogue muristérone A. La première est composée du récepteur de l'ecdysone (VgEcR) modifié au niveau de trois acides aminés du domaine de liaison à l'ADN de façon à obtenir une séquence analogue à celle du récepteur GR et fusionné en phase au domaine de trans-activation de VP16 et la seconde du récepteur de l'acide rétinoïque humain RXR (No et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3346-3351). Les deux ADNc codant pour VgEcR et RXR dirigés par les promoteurs CMV et RSV respectivement sont modifiés par introduction d'un intron en 5' des séquences codantes (intron de pCI pour CMVp-VgEcR et intron  $\beta$ -globine de lapin pour RSVp-RXR) et sont introduits dans la région E1 d'un vecteur adénoviral selon la technique précédente.

Les séquences codant pour le FIX humain sont introduites en aval d'un promoteur inductible comprenant la séquence cible 5xE/GRE couplée au promoteur minimal  $\Delta$ hsp (pIND ; In Vitogen). Comme précédemment, la cassette est introduite dans les deux orientations dans le site Bg/II de pTG4664. La

recombinaison homologue avec pTG6401 digéré par *Sfi*I permet de générer les plasmides portant la cassette inductible dans la région E3 en orientation sens ou anti-sens.

On obtient le vecteur adénoviral doublement recombinant par  
5 recombinaison homologue avec le vecteur de transfert contenant les séquences VgEcR et RXR.

#### EXEMPLE 4 : Production des adénovirus.

10 Les vecteurs adénoviraux recombinants contenant les cassettes d'expression des activateurs et/ou du FIX sont libérés des plasmides correspondants (pTG13083, pTG13092, pTG13233, pTG13234...) par digestion *Pac*I avant d'être transfectés dans la lignée de complémentation 293. Le lysat cellulaire est récolté, soumis à trois étapes successives de  
15 congélation/décongélation afin de libérer les particules virales puis clarifié par centrifugation à 3500 rpm pendant 5 min. Les virions présents dans le surnageant peuvent être éventuellement amplifiés par passage sur une lignée permissive (293 ou A 549-E1+) et purifiés sur gradient de chlorure de césium selon les techniques de l'art. Le stock adénoviral est dialysé dans un tampon de formulation approprié  
20 tel que décrit dans WO98/02522 (par exemple saccharose 1M, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Tris-HCl 10 mM et Tween 80 0,1%). Le titre viral est déterminé en unités infectieuses par dosage de la protéine DBP par immunofluorescence (Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032) ou en nombre de particules virales par mesure spectrophotométrique à 260 nm.

25 Un vecteur contrôle est construit en insérant l'ADNc du facteur IX humain sous le contrôle du promoteur CMV isolé du plasmide pCI (Proméga). La cassette d'expression constitutive est introduite dans la région E3, donnant pTG13231 (orientation sens) et pTG13232 (orientation anti-sens). Les virions sont produits

selon la même méthodologie que ci-dessus.

Une recombinaison homologue entre les plasmides pTG13231 et pTG13232 et le plasmide pTG6401 linéarisé par *SrfI* permet d'obtenir respectivement les plasmides pTG13244 et pTG13245 portant la cassette d'expression constitutive CMV-FIX en orientation sens et antisens dans la région E3.

**EXEMPLE 5 : Evaluation *in vitro* du système inductible par GR<sup>dex</sup>.**

10 Les vecteurs de transfert pTG13064, pTG6242 et pTG13063 portant respectivement les cassettes CMV-GR<sup>dex</sup>, LTR MMTV-FIX (sens) et LTR MMTV-FIX (anti-sens) sont transfectées de manière transitoire dans les cellules 293 (5 µg d'ADN pour 10<sup>6</sup> cellules). En outre, le plasmide pTG13064 est co-transfecté avec soit pTG6242 ou pTG13063. Les cultures sont poursuivies en  
15 présence de dexaméthasone (10<sup>-6</sup> M) ou en son absence. Les surnageants cellulaires sont prélevés 48, 96, 120 et 144 heures après transfection et la quantité de FIX produite est déterminée par ELISA (kit Asserachrom ; Diagnostica Stago). Les résultats présentés dans la Figure 1 montrent une induction de la production de FIX en présence de l'activateur GR<sup>dex</sup> activé par la dexaméthasone. Le  
20 récepteur exprimé par pTG13064 est donc fonctionnel dans la mesure où à l'état activé (en présence de dexaméthasone), il peut se fixer sur les motifs GRE du MMTV et induire la transcription du gène FIX. L'activité basale du système est très faible. En effet, la quantité de FIX produite en l'absence de dexaméthasone ou de pTG13064 est faible, voire négligeable.

25 La cinétique d'expression du FIX en fonction du temps montre que le niveau de production maximal est atteint 120 h après la transfection. Au delà, la concentration stagne ce qui peut s'expliquer par l'état des cellules (à confluence) et un appauvrissement du milieu et probablement en dexaméthasone.

L'efficacité du système a également été évalué par infection adénovirale en présence de dexaméthasone ou non. Les cellules hôtes non permissives Vero ou A549 sont infectées par les virions AdTG13083 ou AdTG13092 portant les cassettes CMV-GR<sup>dex</sup> et MMTV-FIX (sens pour le premier virus et anti-sens pour le second) ou co-infectées par les adénovirus AdTG13075 (CMV-GR<sup>dex</sup>) et AdTG13082 (MMTV-FIX sens) ou AdTG13088 (MMTV-FIX anti-sens). On utilise une MOI (multiplicité d'infection) de 100 pour les expériences d'infection et 50 pour chacun des virus dans les cas de co-infection. La quantité de FIX produite dans les surnageants de culture est dosée par ELISA.

Dans les cellules Vero, l'expression du FIX n'est quantifiable qu'après infection par les virions AdTG13092 portant les deux cassettes et en présence de l'inducteur. Aucune induction n'a lieu en absence de dexaméthasone ou du récepteur GR<sup>dex</sup>. Il est à noter que ces cellules n'expriment pas le GR sauvage.

En cellule A549, le FIX est produit en présence de dexaméthasone dans les cellules infectées par AdTG13088 ou AdTG13092. Il est à noter que ces cellules expriment le GR sauvage. Cependant le niveau de FIX est différé dans le temps en l'absence de GR<sup>dex</sup> (virion AdTG13088).

En conclusion, le système inductible mettant en oeuvre le récepteur GR<sup>dex</sup> et la dexaméthasone est fonctionnel dans les constructions dans lesquelles la cassette inductible MMTV-FIX est en orientation anti-sens (AdTG13088 et AdTG13092). Par ailleurs, le système d'induction *en cis* (cassettes portées par un seul virus) est sensiblement plus productif qu'un système *en trans* mettant en oeuvre deux virus, notamment dans les cellules Vero.

Par ailleurs, l'étude a été reproduite en faisant varier les MOI. Les cellules Vero sont infectées par le virus AdTG13092 à une MOI de 10, 50 ou 100. A titre de contrôle, on utilise l'AdTG13075. Le dosage du FIX est effectué 48 et 72 h après l'infection. On observe une production de FIX quelque soit la MOI employée, mais le niveau optimal d'expression est obtenu pour une MOI de 50.

On a également fait varier la concentration en inducteur de  $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  M. A forte concentration, la dexaméthasone s'avère cytotoxique se traduisant par une moindre expression du FIX. A faible concentration ( $10^{-8}$  M et au delà), l'induction n'est pas efficace. L'optimum se situe à  $10^{-7}$  M.

5 Une analyse de l'effet « dose-réponse » plus détaillée a été conduite en faisant varier la concentration en Dexaméthasone de  $10^{-9}$  à  $10^{-7}$  M. Cette étude a été réalisée en cellules A549 exprimant le récepteur GR sauvage. Une activation peut par conséquent avoir lieu par le biais de ce récepteur activable par la Dexaméthasone. En réalité, on observe pour une concentration en Dexaméthasone  
10 de  $10^{-8}$  M, que l'expression du Facteur IX ne peut être induite qu'après infection par le vecteur AdTG13092 codant pour le récepteur modifié GR<sup>dex</sup>. Cette concentration est ailleurs trop faible pour permettre l'activation du récepteur GR endogène (Figure 1). Par conséquent, nous avons montré que l'induction du gène rapporteur peut se faire de façon contrôlée et sélective, y compris en présence du  
15 récepteur GR sauvage, en utilisant des doses de ligand plus faibles. Cet aspect est important en vue d'applications *in vivo*, conditions naturelles pour lesquelles le récepteur GR sauvage est exprimé.

**EXEMPLE 6 : Evaluation *in vivo* du système inductible par GR<sup>dex</sup>.**

20 Le virus AdTG13092 est injecté par voie intraveineuse à des souris immunocompétentes C57Bl/6 à raison de  $4 \times 10^8$  ou  $8 \times 10^8$  ui. La dexaméthasone est administrée aux animaux par voie intrapéritonéale à une concentration de 100 µg pendant 3 jours consécutifs (à J0, J1 et J2). Les sérum sont prélevés  
25 régulièrement à partir du 3ième jour suivant l'infection et la quantité de FIX produite est évaluée par ELISA. On observe dans ces conditions une production significative de FIX.

**EXEMPLE 7 : Evaluation *in vivo* du système inductible GR<sup>dex</sup> dans des souris immunocompétentes.**

Les virus AdTG13092, AdTG13088 et AdTG13245 sont injectés par voie  
5 intraveineuse à des souris immunocompétentes C57BI/6 à raison de  $5 \times 10^8$  iu. Les virus AdTG13088 et AdTG13075 (Figure 3) sont également co-injectés à raison de  $5 \times 10^8$  iu chacun.

La phase d'induction est réalisée en injectant par voie intrapéritonéale  
100 µg de Dexaméthasone pendant 3 jours consécutifs (à J0-J1-J2, J21-J22-J23  
10 et J42-J43-J44).

Les sérums des souris traitées sont prélevés à différents temps afin d'évaluer la production du Facteur IX par la technique ELISA.

Les résultats (Figures 4a, b, c et d) montrent que :

- 15 - l'expression du gène rapporteur Facteur IX est induite par la Dexaméthasone aussi bien après injection du vecteur AdTG13092 contenant la cassette d'expression du trans-activateur GR<sup>dex</sup> ainsi que la cassette inductible MMTV-FIX, qu'après co-injection de deux vecteurs portant chacun l'une de ces cassettes d'expression ;
- 20 - l'expression du FIX est également induite par la Dexaméthasone après injection du vecteur AdTG13088 seul. Dans ce cas, le niveau d'expression du FIX reste stable au cours des trois inductions. Cette induction est réalisée par le biais du récepteur GR sauvage, exprimé par les cellules murines et activable par la Dexaméthasone. Néanmoins, on peut noter qu'à la première induction, le niveau d'expression du FIX  
25 est 10 fois inférieur à celui obtenu dans le cas des souris exprimant le récepteur modifié GR<sup>dex</sup> ;
- aucune expression n'est détectée en absence de Dexaméthasone, quel que soit le vecteur injecté. On peut valablement en conclure que les

quantités de glucocorticoïdes endogènes sont trop faibles pour permettre l'activation du promoteur MMTV via le récepteur GR sauvage ;

- en présence du récepteur modifié GR<sup>dex</sup>, le niveau d'expression du FIX est comparable au promoteur constitutif CMV.

**EXEMPLE 8 : Evaluation *in vitro* du système inductible par GR<sup>dex</sup> dans des souris immunodéficientes.**

Les virus AdTG13092, AdTG13088 et AdTG13245 (voir Figure 3) sont injectés par voie intraveineuse à des souris immunodéficientes *scid/scid* à raison de  $5 \times 10^8$  iu. Les virus AdTG13088 et AdTG13075 sont également co-injectés à raison de  $5 \times 10^8$  iu chacun. L'induction est réalisée en injectant par voie intrapéritonéale 100 µg de Dexaméthasone pendant 3 jours consécutifs (à J0-J1-J2, J21-J22-J23 et J42-J43-J44).

Les sérums des souris sont prélevés à différents temps afin d'évaluer la production du FIX par la technique ELISA.

Les résultats (Figures 5a, b, c et d) sont comparables à ceux observés dans le cas de souris immunocompétentes :

- l'expression du FIX est induite après injection de Dexaméthasone chez les souris exprimant le récepteur modifié GR<sup>dex</sup> (injection AdTG13092 ou AdTG13088+AdTG13075). Le niveau d'induction chute d'un log après la deuxième et la troisième injections de ligand, puis reste stable pendant la durée de l'expérience (7 mois). Les niveaux d'induction sont comparables en *cis* (injection d'un vecteur adénoviral unique) et en *trans* (injection de deux vecteurs adénoviraux) ;
- l'expression du FIX est induite par la Dexaméthasone après injection du vecteur AdTG13088, par le biais du récepteur GR sauvage. Le

niveau d'induction est stable au cours du temps ;

- aucune expression basale du FIX n'est détectée en absence de Dexaméthasone, quel que soit le vecteur injecté ;
- le niveau d'induction en présence du GR<sup>dex</sup> est comparable à l'expression du gène liée au promoteur constitutif CMV (du moins lors de la première induction) ;
- des études complémentaires ont permis de montrer la présence de l'ADN viral par Southern blot, ainsi que l'expression du GR<sup>dex</sup> par Northern blot, après injection du vecteur AdTG13092 ou AdTG13075 (au moins jusqu'à 56 jours après injection des vecteurs adénoviraux).

**EXEMPLE 9 : Evaluation d'une dose-réponse *in vivo* dans des souris immunodéficientes..**

Les vecteurs AdTG13092 et AdTG13088 sont injectés par voie intraveineuse à des souris immunodéficientes *scid/scid* à raison de  $5 \times 10^8$  iu. L'induction est réalisée en injectant par voie intrapéritonéale 50 ou 5 µg de Dexaméthasone pendant 3 jours consécutifs (à J0-J1-J2 et J21-J22-J23). Les sérums sont prélevés à différents temps afin d'évaluer la production du FIX par ELISA.

Des études préalables ont permis de montrer que l'injection de  $3 \times 100$  µg,  $3 \times 50$  µg ou  $3 \times 20$  µg de Dexaméthasone permet d'obtenir des niveaux d'induction équivalents. Dans cette étude, les inventeurs ont identifié une dose de ligand permettant d'activer l'expression du gène rapporteur via le récepteur modifié GR<sup>dex</sup> apporté par un vecteur adénoviral (AdTG13092), mais incapable d'activer cette expression par le biais du GR endogène (injection AdTG13088).

L'injection de  $3 \times 5$  µg de Dexaméthasone permet d'activer l'expression du FIX en présence du GR<sup>dex</sup>, mais est incapable d'activer cette expression par

l'intermédiaire du GR endogène (Figure 6). Cette dose permet par conséquent d'activer l'expression du transgène de façon contrôlée et sélective, même en présence du récepteur sauvage.

5     **EXEMPLE 10 : Mise au point d'un système d'expression inductible capable de prévenir le développement d'une réponse immunitaire après administration *in vivo* de vecteur adénoviral.**

10       Les vecteurs adénoviraux représentent un système de choix pour transférer un gène thérapeutique chez un patient. Cependant, l'expression du transgène est généralement transitoire. Pour cette raison, il est nécessaire de répéter les administrations du vecteur adénoviral afin d'assurer une expression prolongée du gène thérapeutique. Malheureusement, une première injection d'adénovirus entraîne fréquemment le développement d'une réponse immunitaire qui empêche  
15   toute nouvelle administration. Dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont développé une nouvelle approche reposant sur l'expression d'une molécule immunosuppressive capable d'empêcher la mise en place de cette réponse immunitaire anti-adénovirus. Pour cela, les inventeurs ont inséré le gène codant pour l'interleukine-10 (IL-10) dans un système d'expression inductible porté par  
20   un vecteur adénoviral. L'expression régulée et contrôlée de l'IL-10 permet ainsi la mise au point de protocoles pour lesquels la réadministration de vecteurs portant le gène thérapeutique est possible.

25       a) Implication de la réponse immunitaire dans la persistance des adénovirus recombinants

      - Réponse immunitaire cellulaire :

*Vecteur délété des régions E1 et E3*

      L'importance de la réponse immunitaire a été mise en évidence lors d'expériences réalisées dans des souris immunocompétentes ou immunodéficientes

(Yang Y., F. A. Nunes, K. Berencsi, E. E. Furth, E. Gönczöl and J. M. Wilson. 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91 :4407-4411). Ainsi, l'expression du gène rapporteur *lacZ* est transitoire après injection du vecteur adénoviral dans des souris immunocompétentes, mais stable dans des souris immunodéficientes. Ces études  
5 suggèrent donc que les cellules transduites sont détruites par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). En outre, il a été montré que la génération des CTL est induite par les particules virales injectées, et non seulement par les protéines virales néo-synthétisées.

10        *Vecteur délété des régions E1, E3 et E4 ou E2a*

Les délétions des régions E4 ou E2a font disparaître toute expression résiduelle de protéine virale. Toutefois, la toxicité n'est pas diminuée en éliminant la région E2a. Par contre la délétion de la région E4 conduit à une diminution  
15 significative de la toxicité hépatique après injection intraveineuse. Malgré une persistance de l'ADN, l'expression du transgène est toutefois souvent réduite de façon importante.

- Réponse immunitaire humorale

Plus de 85% de la population mondiale est immunisée contre l'adénovirus  
20 et possède des anticorps anti-adénovirus dirigés contre les sérotypes 2 ou 5. Si aucune ré-infection ne se produit, le titre en anticorps neutralisants chute pour atteindre un niveau indétectable au bout de 2 ans. Ces anticorps peuvent empêcher la fixation du virus sur le récepteur membranaire et sa translocation dans le cytoplasme.

25        Quelles que soient les délétions du génome adénoviral, le système immunitaire humoral est susceptible de reconnaître les protéines de la capside virale et de produire des anticorps neutralisants anti-adénovirus. Des stratégies d'immunosuppression sont donc requises pour permettre une réadministration.

b) Stratégie d'immunosuppression de la réponse immunitaire humorale

L'interleukine-10 est connue pour avoir des propriétés immunosuppressives et a montré des résultats prometteurs dans le cas des rejets de greffe et dans des traitements anti-inflammatoires. L'IL-10 est sécrétée par de nombreuses cellules (monocytes / macrophages, cellules T, cellules B après activation par un antigène) et a de nombreuses cellules cibles (dont les monocytes / macrophages, les cellules B, les cellules T, les neutrophiles et les cellules endothéliales). Elle a un effet pléiotropique et possède des activités immunostimulatrices ou immunosuppressives selon le type cellulaire. Les interleukines-10 humaine et de rat sont très homologues, 84 % d'homologie au niveau nucléotidique et 73% au niveau protéique.

L'IL-10 a un effet immunosuppresseur sur les monocytes/macrophages. Elle inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, ainsi que l'expression du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation. Elle limite aussi la durée de la réponse inflammatoire des granulocytes et des éosinophiles.

A l'opposé, l'IL-10 stimule la viabilité, la sécrétion d'anticorps et l'expression du CMH de classe II des lymphocytes B. Elle possède également un rôle de stimulation sur les mastocytes et sur les cellules T CD8<sup>+</sup>. Globalement, l'IL-10 a toutefois un très fort effet immunosuppresseur.

Les propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives de l'IL-10 pourraient intervenir dans la suppression de la production d'anticorps neutralisants contre l'adénovirus recombinant. En effet, la co-injection d'adénovirus codant pour l'IL-10 et pour la  $\beta$ -galactosidase empêche l'induction de la réponse immunitaire contre le virus et la production de CTL, permettant ainsi une expression prolongée du gène rapporteur.

Cependant, une immunosuppression prolongée est associée à des effets secondaires non négligeables il est donc souhaitable d'obtenir une immunosuppression de façon transitoire et régulable.

## c) Système inductible selon l'invention

Le système que nous avons développé est basé sur l'induction par les hormones. En effet, celles-ci vont se fixer sur leur récepteur nucléaire, constitué d'un domaine de fixation à l'hormone, d'un domaine de fixation à l'ADN et d'un domaine de transactivation. Après changement conformationnel et fixation sur les éléments cibles localisés au niveau de l'ADN, la transcription du gène situé en aval du promoteur régulable sera ainsi activée. Afin d'éviter toutefois l'activation par les hormones endogènes, éléments non contrôlables, les inventeurs ont choisi d'utiliser des récepteurs modifiés au niveau du domaine de fixation à l'hormone. Ces récepteurs mutés tels que les récepteurs aux œstrogènes ou à la progestérone sont capables de répondre à des ligands exogènes synthétiques, mais pas aux hormones endogènes.

Les inventeurs ont développé un système basé sur le récepteur aux glucocorticoïdes modifié, GR<sup>dex</sup>, capable d'induire l'expression du transgène situé en aval des éléments GRE (Glucocorticoid Responsive Element) après activation par la dexaméthasone, mais pas par les glucocorticoïdes endogènes. Au cours de cette étude, différents vecteurs adénoviraux exprimant l'IL-10 de façon inductible ont été générés, afin d'évaluer leurs effets sur la réponse immunitaire anti-adénovirus.

## d) Génération des vecteurs adénoviraux

Tous les vecteurs adénoviraux dérivent du plasmide pTg6401 comportant le génome de l'adénovirus humain de type 5 délété des nucléotides 459 à 3327 (région )E1) et des nucléotides 28 592 à 30 470 (région )E3).

Insert en E1 : Le gène modifié GR<sup>dex</sup> est introduit dans la région E1 du génome de l'adénovirus de type 5 par recombinaison homologue entre le plasmide pTg6401 et le plasmide de transfert contenant l'ADNc GR<sup>dex</sup> sous contrôle du

promoteur CMV (Cytomegalovirus), d'un intron chimérique (pCI, Promega) et d'un signal de polyadénylation du SV40.

Insert en E3 : L'ADNc de l'IL-10 de rat (Feng L., W.W. Tang, J.C. Chang  
5 and C.B. Wilson. 1993. Biochem. Biophys Res. Commun.. 192 :452-45) a été  
obtenu par PCR inverse sur les ARNm totaux de cellules de rat au moyen des  
oligonucléotides OTG12237 (CTAGTCTAGA CCACCATGCT TGGCTCAGCA  
CTGCT=SEQ ID N° 1) et OTG12243 (TTTATAGCGG CCGCTCAATT  
TTTCATTTTG AGTG=SEQ ID N° 2), par 30 cycles de dénaturation (1 minute  
10 à 95°C), hybridation des amorces (1 minute à 65°C) et extension (1 minute à  
72°C). L'ADNc est placé en aval de 4 éléments de réponse aux glucocorticoïdes  
GRE (Glucocorticoid Responsive Element) contenus dans le promoteur LTR du  
MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus). Cette cassette d'expression est  
introduite dans le plasmide de transfert délété de la région E3 dans l'orientation  
15 anti-sens par rapport à la région E3 sauvage de l'adénovirus.

Une recombinaison homologue de ce vecteur de transfert avec les vecteurs  
adénoviraux Ad-GR<sup>dex</sup> ou pTg6401 permet de générer respectivement soit un  
vecteur portant la cassette d'expression de l'activateur en E1 et la cassette  
inductible en E3 en orientation antisens (Ad-GR<sup>dex</sup>-MMTV/IL-10-E4 sauvage) soit  
20 un vecteur contenant uniquement la cassette d'induction en E3 (Ad-ΔE1-  
MMTV/IL10-E4 sauvage).

L'ADNc de l'IL-10 de rat a également été placé sous contrôle du  
promoteur CMV. Cette cassette d'expression constitutive a été insérée dans la  
région E3 de pTg6401 en orientation antisens (Ad-ΔE1-CMV/IL10).

25 Toutes les constructions de deuxième génération sont obtenues par  
recombinaison homologue entre le plasmide de transfert contenant les cadres de  
lecture 3 et 4 (ORF3,4) de la région E4 et les vecteurs de première génération  
précédents.

L'ensemble des constructions de première et de deuxième générations sont

illustrées dans la Figure 7.

e) Evaluation de l'expression de l'IL-10 *in vitro*

*Transfection transitoire dans des cellules 293*

5 Les cellules 293 sont transfectées par les plasmides de transfert contenant les cassettes d'expression de l'interleukine-10 de rat en présence ou non de la cassette d'expression de l'activateur GR<sup>dex</sup>. Elles sont mises en culture en présence ou non de dexaméthasone ( $10^{-7}$  M) en DMEM 10% SVF. Les surnageants sont prélevés à différents temps afin d'analyser l'expression du transgène.

10

*Validation in vitro des adénovirus recombinants dans des cellules A549 et VERO*

15 Les cellules A549 et VERO sontensemencées la veille à  $3 \cdot 10^5$  cellules dans des plaques de 6 puits. Les cellules sont infectées à une MOI de 50 avec les différents préstocks viraux dans 250  $\mu$ l DMEM 2% SVF. Après 30 minutes d'adsorption à 37°C, 3ml de DMEM 2% SVF sont rajoutés sur les cellules en présence ou non de dexaméthasone  $10^{-7}$ M. Les surnageants sont prélevés à différents temps afin d'analyser l'expression du transgène.

20 *Quantification de l'expression de l'IL-10 de rat par test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)*

La détection de l'IL-10 de rat est réalisée à l'aide du kit OptEIA<sup>TM</sup> (Pharmingen). Les kits sont utilisés selon les spécifications des fabricants.

25 L'induction de l'IL-10 par la dexaméthasone a été évaluée par transfection transitoire des plasmides de transfert dans des cellule 293. La capacité d'induction est analysée en co-transfectant le vecteur de transfert MMTV-IL10 avec le vecteur exprimant le trans-activateur GR<sup>dex</sup>. La transfection du plasmide MMTV-IL10 seul indiquera le niveau d'expression de l'IL-10 en absence du trans-activateur. De plus, le niveau d'induction est comparé à l'expression constitutive de l'IL-10 sous

contrôle du promoteur CMV, en transfectant également ce plasmide dans les cellules 293. L'induction est réalisée en présence ou non de dexaméthasone à une concentration de  $10^{-7}$  M. Les surnageants de culture sont prélevés 72 et 120 heures après la transfection afin de quantifier l'IL-10 par kit ELISA. La co-transfection

5 des plasmides MMTV-IL10 et GR<sup>dex</sup> en présence de dexaméthasone permet l'induction de l'IL-10 (50 ng / ml à 120 H post-transfection).

Les inventeurs ont démontré que l'apport du trans-activateur GR<sup>dex</sup> et du ligand dexaméthasone permet une induction de l'expression de l'IL-10 sous contrôle du promoteur inductible MMTV.

10 L'efficacité d'induction de l'IL-10 par la dexaméthasone couplée au GR<sup>dex</sup> a été évaluée *in vitro* par infection des cellules humaines A549 et des cellules simiennes VERO avec les vecteurs Ad-MMTV-IL10 ± AdGR<sup>dex</sup> ou Ad-GR<sup>dex</sup>-MMTV-IL10. Ces deux types d'infection permettent d'évaluer l'efficacité d'induction en *trans* ou en *cis*. Les cultures cellulaires sont réalisées en présence

15 ou non de dexaméthasone  $10^{-7}$  M. Les quantités d'IL-10 obtenues seront comparées à celle obtenues après infection par Ad-CMVIL-10 exprimant cette cytokine de façon constitutive. D'autre part, l'induction de l'IL-10 est comparée à celle du facteur IX humain inséré dans les mêmes constructions, évaluées *in vitro* au préalable. Les surnageants sont prélevés à 24, 48, 72 et 96 heures post-infection

20 afin de quantifier l'IL-10 et le facteur IX produits, au moyen de kits ELISA.

En cellules VERO, l'expression de l'IL-10 est induite lorsque les cellules sont co-infectées par Ad-MMTV-IL10 + Ad-CMV-GR<sup>dex</sup> en présence de dexaméthasone, pour atteindre 50,8 ng/ml 96 heures après infection. En absence du ligand, l'IL-10 est à peine détectable (1,2 ng/ml). Au contraire, en absence du

25 trans-activateur GR<sup>dex</sup>, aucune induction significative de l'expression de l'IL-10 ne peut être notée (3 ng/ml en présence de dexaméthasone, correspondant à l'expression résiduelle obtenue en transfection transitoire ; 0,7 ng/ml en absence de dexaméthasone).

Les inventeurs ont donc pu démontrer qu'en cellules VERO, l'expression

de l'IL-10 peut être induite par la dexaméthasone couplée au GR<sup>dex</sup> en « *trans* », lorsque les deux cassettes d'expression sont portées par deux vecteurs adénoviraux différents.

En cellules A549, ils ont également pu vérifier la fonctionnalité du système  
5 inductible en « *trans* ». En effet, la concentration en IL-10 atteint 32,3 ng/ml en présence de dexaméthasone après co-infection par les vecteurs Ad-MMTV-IL10 + Ad-CMV-GR<sup>dex</sup>. En absence de ligand, la cytokine est indétectable. L'expression de l'IL-10 est également induite par la dexaméthasone après infection par le  
10 vecteur Ad-MMTV-IL10 seul. Cette activation se fait par le biais du récepteur GR sauvage exprimé par les cellules A549.

### REVENDEICATIONS

1. Système d'expression inductible comprenant :

- 5 (i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel d'origine eucaryote ou virale, placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte, et
- 10 (ii) un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

2. Système d'expression selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel comprend au moins un domaine de trans-activation, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand (DLL).

15

3. Système d'expression selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel comporte tout ou partie d'un domaine dérivé d'un récepteur d'hormones stéroïdes choisi parmi le groupe constitué par les récepteurs oestrogène (ER), glucocorticoïde (GR), progestérone (PR), Vitamine D, ecdysone
- 20 (EcR), minéralocorticoïde, androgène, hormone thyroïde, acide rétinoïque et acide rétinoïque X ou encore d'une immunophiline ou d'un récepteur aryl hydrocarbon (AhR).

4. Système d'expression selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit

25 activateur transcriptionnel est choisi parmi :

- (i) un polypeptide désigné GR<sup>dex</sup> comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivés d'un récepteur aux glucocorticoïdes, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment

- par substitution de l'isoleucine en position 747 par une thréonine ;
- (ii) un polypeptide désigné ER<sup>T</sup> comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un DLL dérivé d'un récepteur à l'oestrogène, ledit récepteur étant modifié dans son DLL, notamment par substitution de la glycine en position 521 par une arginine ;
- 5 (iii) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un DLL dérivé du récepteur à l'ecdysone, un domaine de liaison à l'ADN hybride dérivé de ceux des récepteurs EcR et GR et un domaine de trans-activation dérivé de la protéine virale VP16 et un second
- 10 polypeptide dérivé de la protéine USP de drosophile ou d'un homologue tel que le récepteur de l'acide rétinoïque X (RXR) humain ;
- (iv) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un domaine de liaison à l'ADN dérivé du facteur de transcription ZFHD1 et un DLL dérivé de l'immunophiline FKBP12 et un
- 15 second polypeptide comportant un domaine de trans-activation dérivé du facteur NFκB p65 et un DLL dérivé de FRAP (FKBP12-rapamycine-associated protein) ; et
- (v) un activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide dérivé du récepteur AhR et un second polypeptide dérivé de la protéine Arnt
- 20 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator).

5. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce en ce que ledit activateur transcriptionnel comprend un DLL et un domaine de trans-activation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN

25 hétérologue, notamment dérivé de la protéine de levure Gal4.

6. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel est activé par liaison d'un inducteur non naturel et

n'est pas ou peu activé par un composé humain naturel.

7. Système d'expression selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit inducteur non naturel est une substance synthétique administrable par voie orale.

5

8. Système d'expression selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit inducteur est choisi parmi le groupe constitué par la dexaméthasone, le tamoxifène, le muristérone A, l'ecdysone, la rapamycine et le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine ou un analogue de ces composés.

10

9. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt code pour un ARN anti-sens, un ribozyme, ou encore un polypeptide d'intérêt.

15

10. Système d'expression selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit polypeptide d'intérêt est choisi parmi le groupe constitué par les chémokines, les cytokines, les récepteurs cellulaires, les ligands, les facteurs de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, les facteurs de croissance, les enzymes, les inhibiteurs d'enzyme, les polypeptides à effet anti-tumoral, les polypeptides capables d'inhiber une infection bactérienne, parasitaire ou virale, les polypeptides agissant sur l'apoptose, les agents cytostatiques, les immunoglobulines, les apolipoprotéines, les produits cytotoxiques, les produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, les antigènes associés aux tumeurs, les immunotoxines, les inhibiteurs d'angiogénèse et les marqueurs.

20

11. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que ledit promoteur inductible comprend une ou plusieurs séquence(s) cible(s) répondant à un activateur transcriptionnel tel que défini dans l'une des revendications 2 à 8.

25

12. Système d'expression selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite séquence cible est une séquence ERE, GRE, EcR, UAS, 5xE/GRE, XRE ou une séquence cible répondant au facteur de transcription ZFDH-1.

5

13. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques et leurs éléments de régulation sont portés par ledit vecteur adénoviral recombinant.

10 14. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques et leurs éléments de régulation sont portés par un vecteur d'expression indépendant autre que ledit vecteur adénoviral recombinant.

15 15. Système d'expression selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit vecteur indépendant est un vecteur synthétique, un plasmide ou un vecteur viral, notamment dérivé d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus associé à l'adénovirus (AAV), d'un virus de l'herpès, d'un alphavirus, d'un parvovirus, d'un poxvirus (fowlpox, canaripox, virus de la vaccine..) ou d'un foamyvirus.

20

16. Système d'expression selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et, le cas échéant, ledit vecteur adénoviral indépendant sont déficients pour la fonction E1 par délétion de tout ou partie de la région E1 ou mutation non fonctionnelle de cette dernière.

25

17. Système d'expression selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et/ou ledit vecteur adénoviral indépendant est/sont en outre déficient(s) pour au moins l'une des fonctions E2, E4, L1, L2, L3, L4 et/ou L5.

18. Système d'expression selon la revendication 16 ou 17, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et/ou ledit vecteur adénoviral indépendant est/sont en outre dépourvu(s) de tout ou partie de la région non essentielle E3.

5

19. Système d'expression selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant et, le cas échéant, ledit vecteur indépendant sont sous forme de particules virales infectieuses.

10 20. Vecteur adénoviral recombinant comprenant

(i) les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriés à leur expression dans une cellule ou un organisme hôte, et

15 (ii) un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé *en trans* par ledit activateur transcriptionnel.

21. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 20, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques codent pour un activateur transcriptionnel selon l'une des revendications 2 à 6 ou pour un activateur transcriptionnel  
20 procaryotique, notamment un polypeptide comprenant un DLL et un domaine de liaison à l'ADN dérivé d'un répresseur de l'opéron tétracycline.

22. Vecteur adénoviral recombinant selon la revendication 21, caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques codent pour le polypeptide tTA comprenant  
25 un répresseur de l'opéron tétracycline (tetR) fusionné en phase à un domaine d'activation de la transcription dérivé de la protéine virale VP16.

23. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisé en ce que ledit inducteur non naturel est tel que défini dans la

revendication 7 ou 8 ou est constitué par la doxycycline ou la tétracycline.

24. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 23, caractérisé en ce que ledit gène d'intérêt est tel que défini dans la revendication 9  
5 ou 10.

25. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 24, caractérisé en ce que ledit promoteur inductible est tel que défini dans la revendication 11 ou 12 ou comprend une ou plusieurs séquence(s) cible(s) tetO.  
10

26. Vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 25, caractérisé en ce que ledit vecteur adénoviral recombinant est tel que défini dans l'une des revendications 16 à 18.

15 27. Particule virale infectieuse comprenant un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26.

28. Procédé de préparation d'une particule virale selon la revendication 27, dans lequel :

- 20 (i) on introduit un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26 dans une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une cellule de complémentation transfectée,  
(ii) on cultive ladite cellule de complémentation transfectée dans des  
25 conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et  
(iii) on récupère ladite particule virale dans la culture cellulaire.

29. Cellule eucaryote comprenant un système d'expression selon l'une des  
30 revendications 1 à 19, un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des

revendications 20 à 26 ou une particule virale infectieuse selon la revendication 27.

30. Composition pharmaceutique comprenant un système d'expression selon l'une des revendications 1 à 19, un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26, une particule virale infectieuse selon la revendication 27 ou une cellule eucaryote selon la revendication 29 et un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

31. Composition pharmaceutique selon la revendication 30, caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

32. Utilisation d'un système d'expression selon l'une des revendications 1 à 19, d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26, d'une particule virale infectieuse selon la revendication 27 ou d'une cellule eucaryote selon la revendication 29, pour la préparation d'un médicament destiné au transfert et à l'expression dudit gène d'intérêt dans une cellule ou un organisme hôte.

33. Utilisation d'un système d'expression selon l'une des revendications 1 à 19, d'un vecteur adénoviral recombinant selon l'une des revendications 20 à 26, d'une particule virale infectieuse selon la revendication 27 ou d'une cellule eucaryote selon la revendication 29, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies par thérapie génique.

34. Activateur transcriptionnel comprenant un DLL et un domaine de trans-activation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN hétérologue, notamment dérivé de la protéine de levure Gal4.

**FIGURE 1**

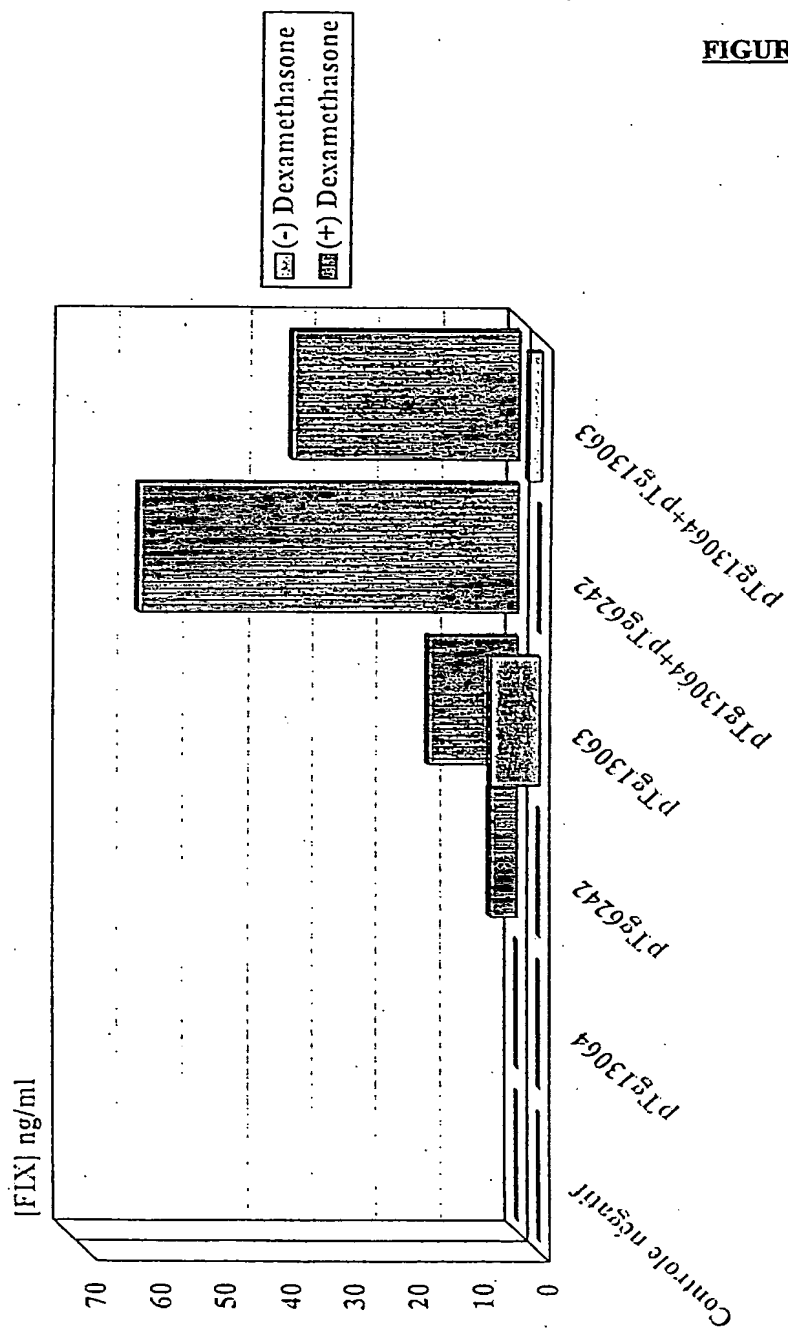
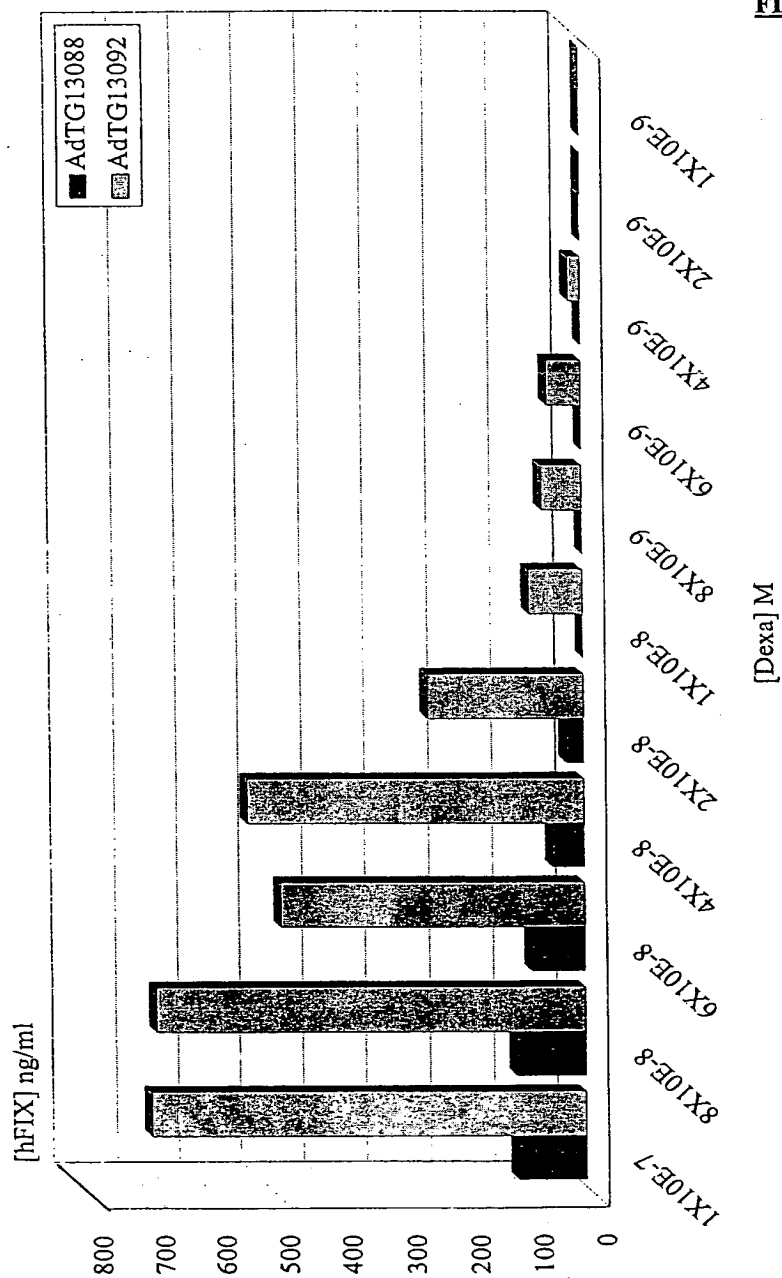
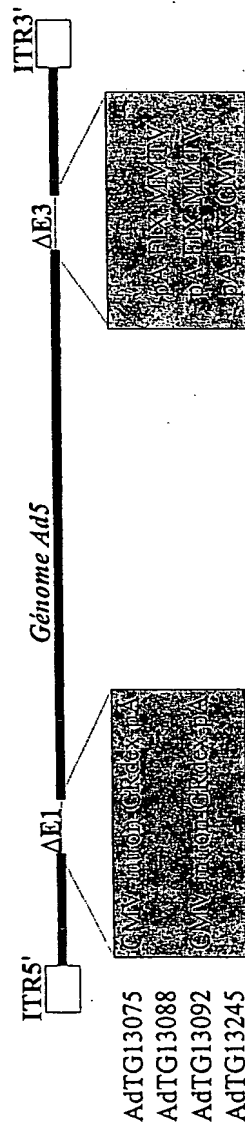


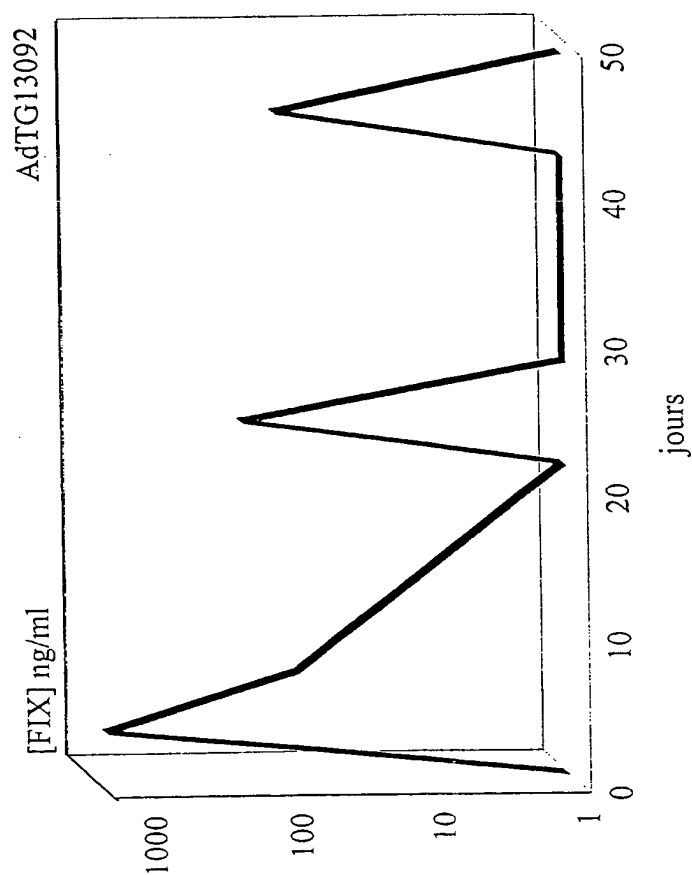
FIGURE 2



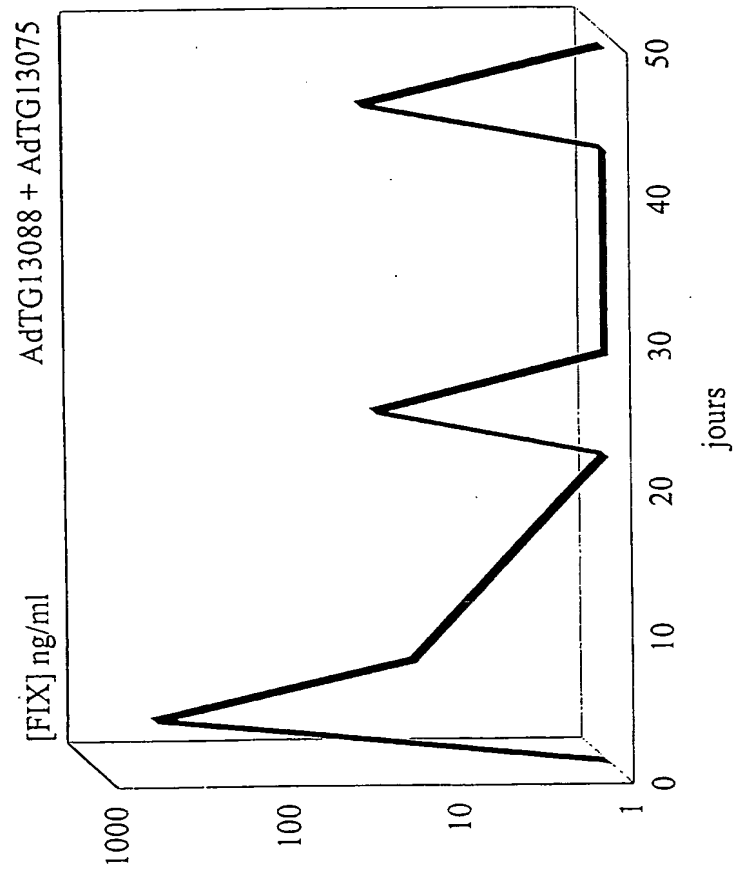
**FIGURE 3**



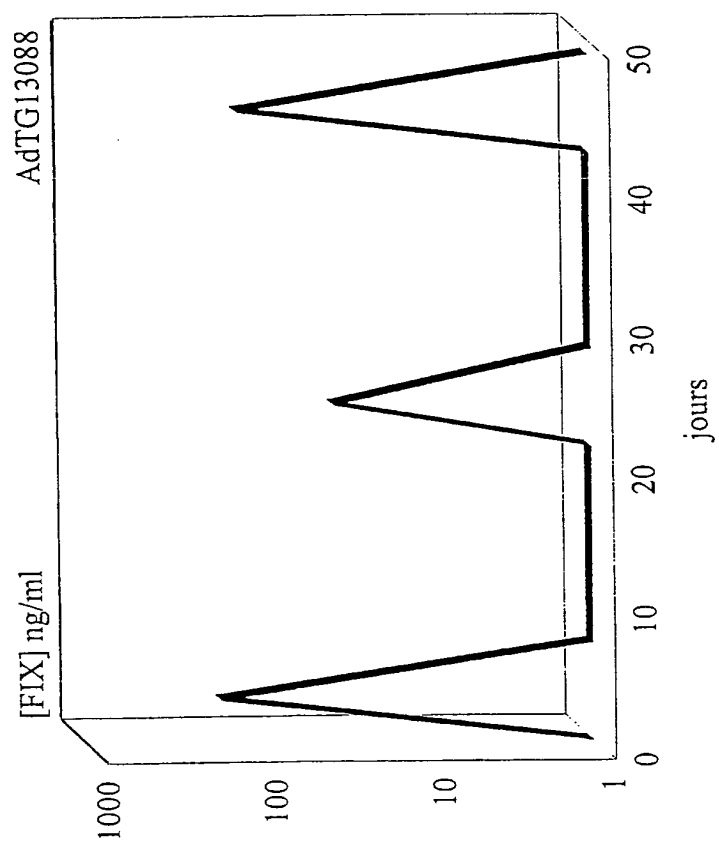
**FIGURE 4a**



**FIGURE 4b**

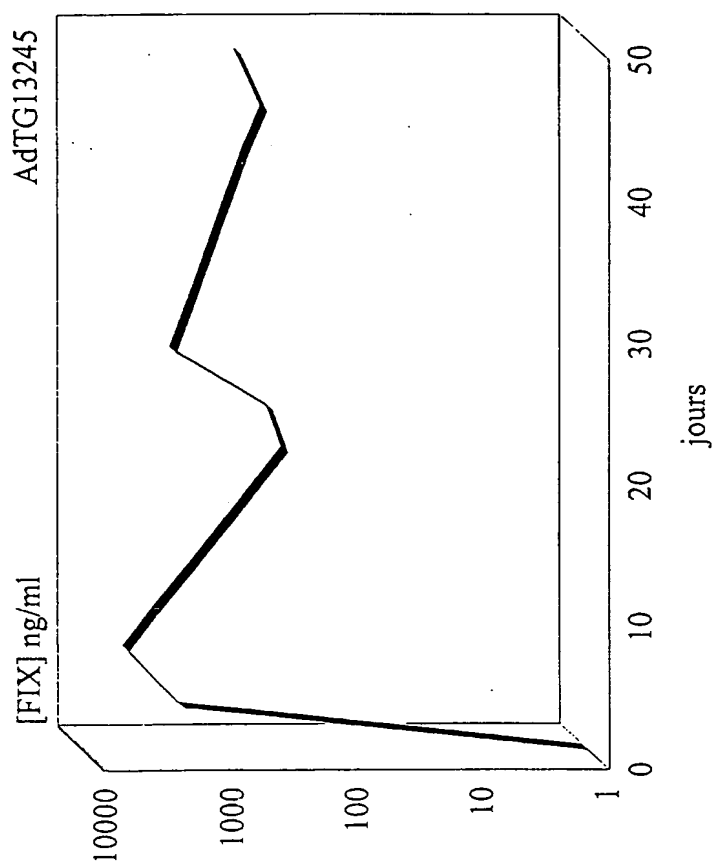


**FIGURE 4c**

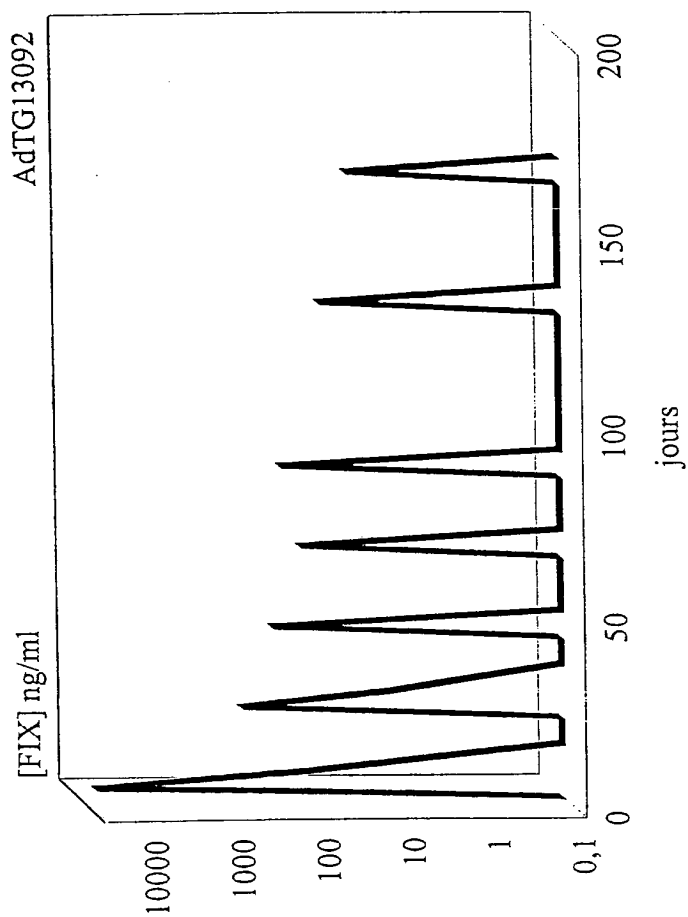


7/13

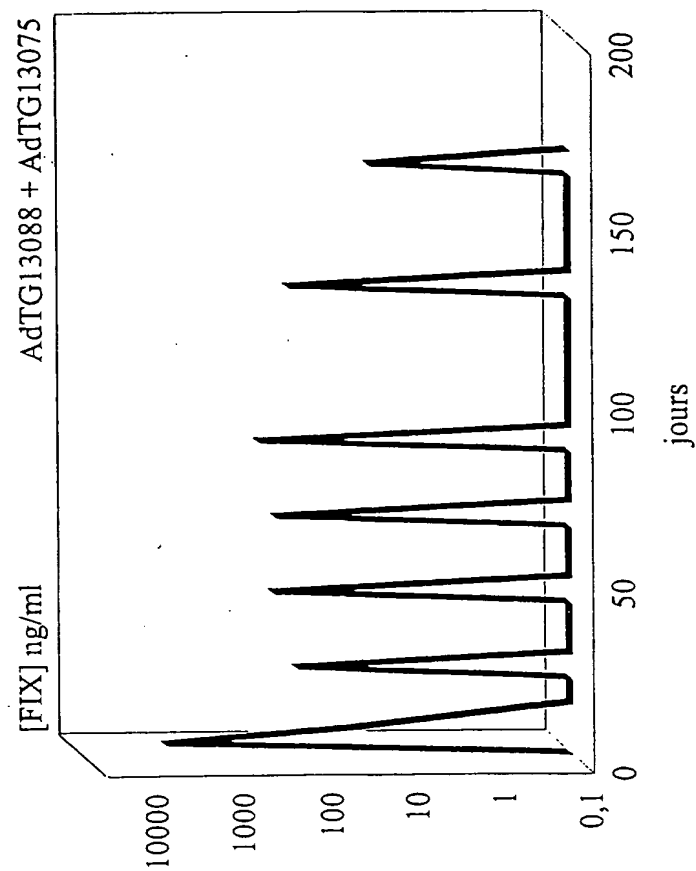
**FIGURE 4d**



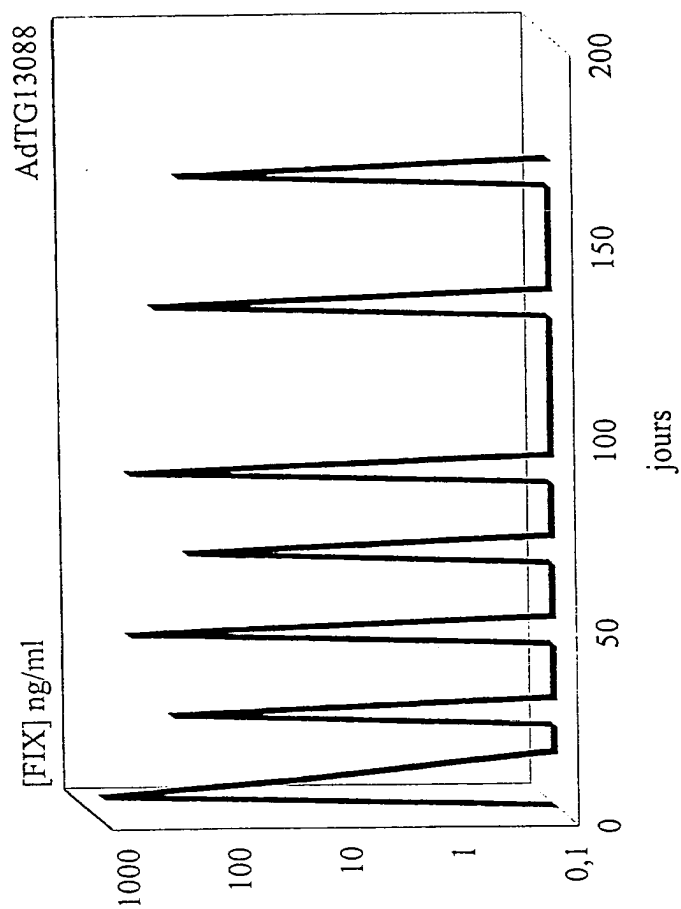
**FIGURE 5a**



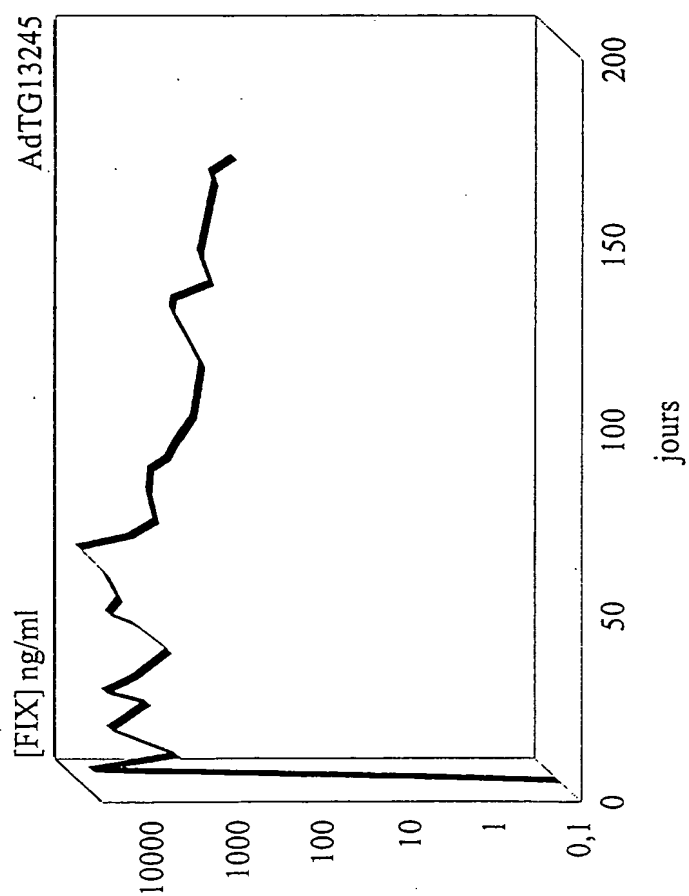
**FIGURE 5b**



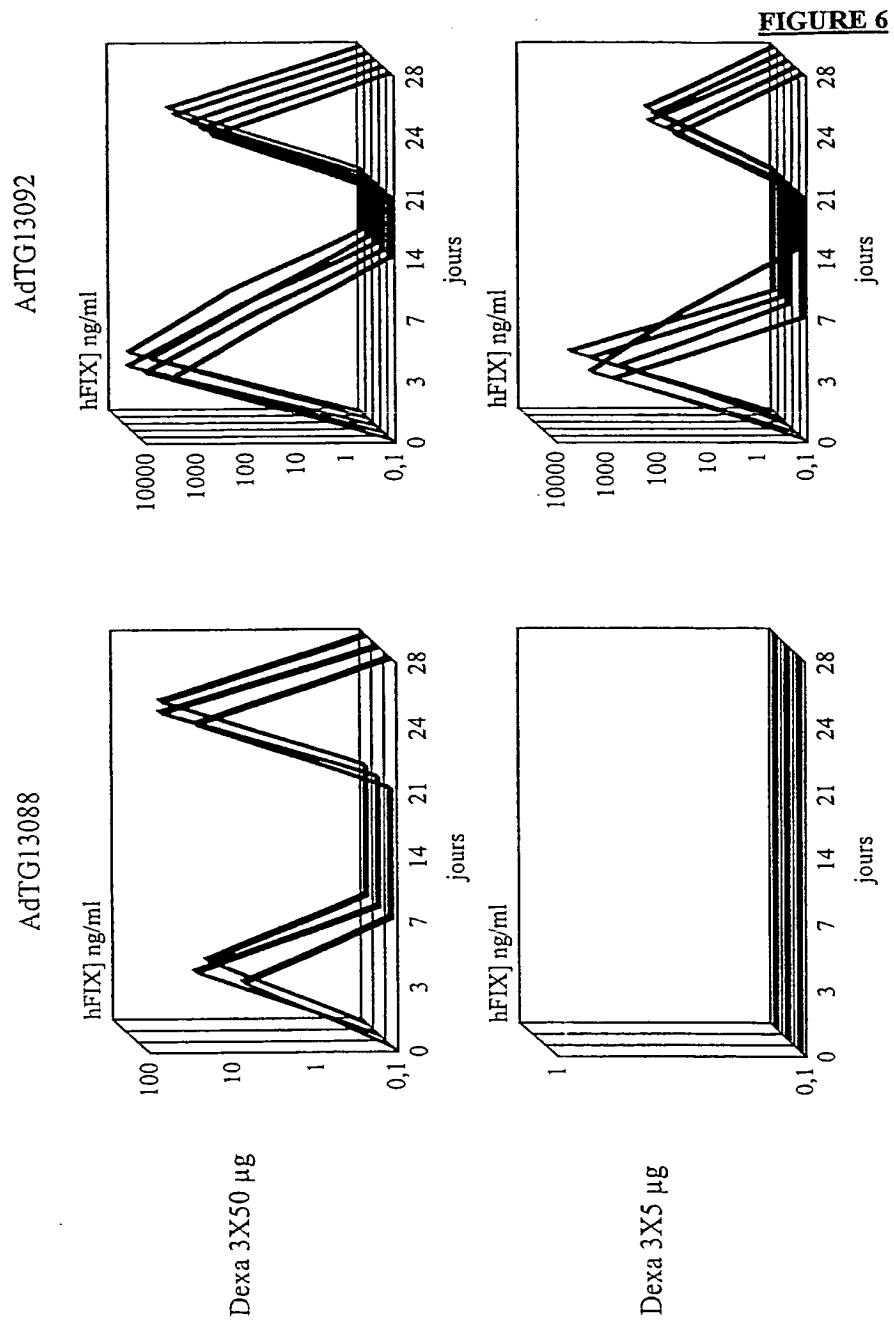
**FIGURE 5c**



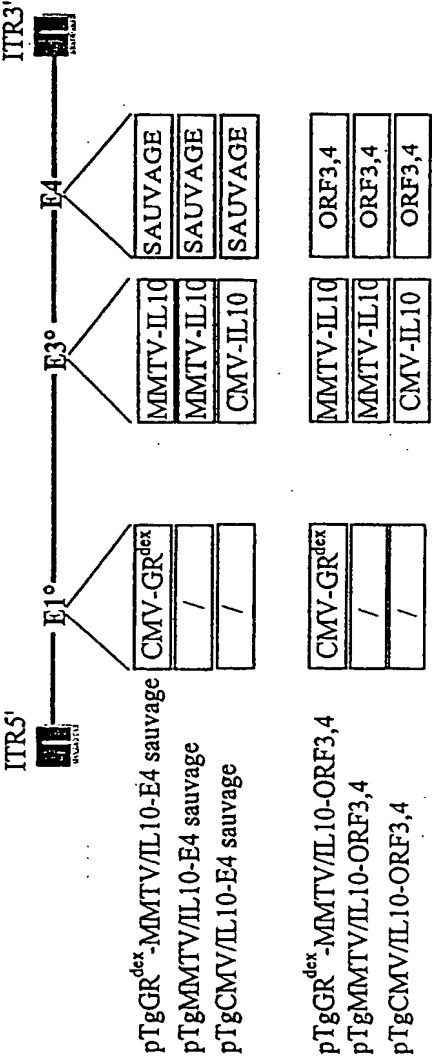
**FIGURE 5d**



12/13



**FIGURE 7**



## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; TRANSGENE

&lt;120&gt; SYSTEME D'EXPRESSION INDUCTIBLE

&lt;130&gt; D17688

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; OTG12237

&lt;400&gt; 1

ctagtctaga ccaccatgct tggctcagca ctgct

35

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; OTG12243

&lt;220&gt;

&lt;400&gt; 2

tttatagcgg ccgctcaatt ttcatTTTTg agtg

34

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02051

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/861 C12N15/62 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NARUMI K ET AL: "Intermittent, repetitive corticosteroid-induced upregulation of platelet levels after adenovirus-mediated transfer to the liver of a chimeric glucocorticoid-responsive promoter controlling the thrombopoietin cDNA" BLOOD, vol. 92, no. 3, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 822-833, XP002104566	1-3
Y	abstract --- -/--	4-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 2000

Date of mailing of the international search report

22. 02. 00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lonnoy, 0

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/02051

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIH W ET AL: "AN ADENOVIRAL VECTOR SYSTEM FOR FUNCTIONAL IDENTIFICATION OF NUCLEAR RECEPTOR LIGANDS" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 5, no. 2, 1 February 1991 (1991-02-01), pages 300-309, XP000386396	1-3
Y	abstract	4-19
	---	
X	WO 98 37185 A (HU SHI XUE ;UNIV TEXAS (US); XU HONG JI (US); ZHOU YUNLI (US); LOG) 27 August 1998 (1998-08-27)	20-33
Y	claim 29	4-19
	---	
X	BRASELMANN S ET AL: "A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 90, no. 5, 1 March 1993 (1993-03-01), pages 1657-1661, XP002104567	34
Y	figure 5	4-19
	---	
Y	WO 97 31108 A (ASS POUR LE DEV DE LA RECH ;BROCARD JACQUES BERTRAND (FR); CHAMBON) 28 August 1997 (1997-08-28)	4-19
	claim 14	
	---	
Y	WO 97 38117 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI ;EVANS ROLAND M (US); NO DAVID (US)) 16 October 1997 (1997-10-16)	4-19
	figure 2	
	---	
Y	DANIELIAN P ET AL: "Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen." MOL. ENDOCRINOL., vol. 7, no. 2, February 1993 (1993-02), pages 232-240, XP002104568	4-19
	abstract	
	---	
Y	WILSON J: "A pharmacologic rheostat for gene therapy" NAT MED, vol. 2, no. 9, September 1996 (1996-09), pages 977-978, XP002129577	4-19
	the whole document	
	---	
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/02051

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUKUNAGA B ET AL: "Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 270, no. 48, 8 December 1995 (1995-12-08), pages 29270-29278, XP002129578 ---	
A	EP 0 316 717 A (DAIICHI SEIYAKU CO) 24 May 1989 (1989-05-24) ---	
A	WO 97 44475 A (LUSKY MONIKA ;MEHTALI MAJID (FR); LEROY PIERRE (FR); TRANSGENE SA) 27 November 1997 (1997-11-27) ---	
A	WO 96 30512 A (BRACCO LAURENT ;TOCQUE BRUNO (FR); RHONE POULENC RORER SA (FR); SC) 3 October 1996 (1996-10-03) ---	
A	OLIGINO T ET AL: "Drug inducible transgene expression in brain using a herpes simplex virus vector" GENE THERAPY, vol. 5, no. 4, April 1998 (1998-04), page 491-496 XP002104570 -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02051

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 99/02051

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1-4, 6-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Inducible expression system comprising nucleotide sequences coding for a transcriptional activator and a recombinant adenoviral vector comprising a gene of interest placed under the control of an inducible promoter capable of being activated by said transcriptional activator, said system being characterised in that said transcriptional activator is GRdex; recombinant adenoviral vector comprising the nucleotide sequences coding for a transcriptional activator placed under the control of regulating elements suited for their expression and a gene of interest placed under the control of an inducible promoter capable of being activated by said transcriptional activator; said adenoviral vector being characterised in that said nucleotide sequences code for said transcriptional activator; infectious viral particle, method for preparing said particle, eukaryotic cell comprising said expression system, pharmaceutical composition, and use of said system.

2. Claims: 1-4, 6-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Identical to subject 1, but said transcriptional activator being ER-T.

3. Claims: 1-4, 6-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Identical to subject 1, but said transcriptional activator comprising a first polypeptide including an ecdysone receptor DLL derivative, a DNA binding domain derived from EcR and GR receptors, and a transactivation domain derived from the VP16 viral protein, and a second polypeptide derived from the USP protein of drosophile or of a homologue.

4. Claims: 1-4, 6-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Identical to subject 1, but said transcriptional activator comprising a first polypeptide including a DNA binding domain derived from ZFHD1 and a DLL derived from FKBP12 and a second polypeptide including a transactivation domain derived from p65 and a DLL derived from FRAP.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02051

5. Claims: 1-4, 6-33 ( all partly, inasmuch as applicable)

Identical to subject 1, but said transcriptional activator comprising a first polypeptide derived from AhR and a second polypeptide derived from Arnt.

6. Claims: 20-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Recombinant adenoviral vector comprising all the nucleotide sequences coding for a transcriptional activator placed under the control of regulating elements suited for their expression and a gene of interest placed under the control of an inducible promoter capable of being activated by said transcriptional activator; said vector being characterised in that said nucleotide sequences code for the tTA polypeptide; infectious viral particle, method for preparing said particle, eukaryotic cell comprising said expression system, pharmaceutical composition, and use of said system.

7. Claims 5, 34 (wholly) and 1-4, 6-33 (all partly, inasmuch as applicable)

Identical to subject 1, but said transcriptional activator comprising a DLL and a transactivation domain derived from a steroid receptor and a heterologous DNA binding domain in particular derived from the Gal4 yeast protein.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02051

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9837185	A	27-08-1998	NONE	
WO 9731108	A	28-08-1997	FR 2745008 A AU 707684 B AU 2098997 A CA 2247517 A EP 0896620 A	22-08-1997 15-07-1999 10-09-1997 28-08-1997 17-02-1999
WO 9738117	A	16-10-1997	AU 2557297 A CA 2251466 A CN 1215432 A EP 0910652 A	29-10-1997 16-10-1997 28-04-1999 28-04-1999
EP 0316717	A	24-05-1989	AT 101198 T CA 1309044 A DE 3887635 D DE 3887635 T ES 2061604 T JP 2000466 A JP 2826114 B US 5646013 A US 5534419 A	15-02-1994 20-10-1992 17-03-1994 01-06-1994 16-12-1994 05-01-1990 18-11-1998 08-07-1997 09-07-1996
WO 9744475	A	27-11-1997	FR 2748753 A AU 3036197 A	21-11-1997 09-12-1997
WO 9630512	A	03-10-1996	FR 2732348 A AU 5402096 A BR 9607928 A CA 2214451 A CZ 9703080 A EP 0817845 A HU 9801221 A JP 11503011 T NO 974449 A SK 131197 A ZA 9602506 A	04-10-1996 16-10-1996 09-06-1998 03-10-1996 14-01-1998 14-01-1998 28-08-1998 23-03-1999 26-09-1997 06-05-1998 01-10-1996

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCT/FR 99/02051

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/861 C12N15/62 C12N5/10 A61K48/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	NARUMI K ET AL: "Intermittent, repetitive corticosteroid-induced upregulation of platelet levels after adenovirus-mediated transfer to the liver of a chimeric glucocorticoid-responsive promoter controlling the thrombopoietin cDNA" BLOOD, vol. 92, no. 3, 1 août 1998 (1998-08-01), pages 822-833, XP002104566	1-3
Y	abrégé --- -/--	4-19
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 2 février 2000		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 22.02.00
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patendaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Lonnoy, 0

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCT/FR 99/02051

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SHIH W ET AL: "AN ADENOVIRAL VECTOR SYSTEM FOR FUNCTIONAL IDENTIFICATION OF NUCLEAR RECEPTOR LIGANDS" MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 5, no. 2, 1 février 1991 (1991-02-01), pages 300-309, XP000386396	1-3
Y	abrégé	4-19
X	WO 98 37185 A (HU SHI XUE ;UNIV TEXAS (US); XU HONG JI (US); ZHOU YUNLI (US); LOG) 27 août 1998 (1998-08-27)	20-33
Y	revendication 29	4-19
X	BRASELMANN S ET AL: "A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 90, no. 5, 1 mars 1993 (1993-03-01), pages 1657-1661, XP002104567	34
Y	figure 5	4-19
Y	WO 97 31108 A (ASS POUR LE DEV DE LA RECH ;BROCARD JACQUES BERTRAND (FR); CHAMBON) 28 août 1997 (1997-08-28)	4-19
Y	revendication 14	
Y	WO 97 38117 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI ;EVANS ROLAND M (US); NO DAVID (US)) 16 octobre 1997 (1997-10-16)	4-19
Y	figure 2	
Y	DANIELIAN P ET AL: "Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen." MOL. ENDOCRINOL., vol. 7, no. 2, février 1993 (1993-02), pages 232-240, XP002104568	4-19
Y	abrégé	
Y	WILSON J: "A pharmacologic rheostat for gene therapy" NAT MED, vol. 2, no. 9, septembre 1996 (1996-09), pages 977-978, XP002129577	4-19
	le document en entier	
	-/--	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. -le Internationale No  
PC./FR 99/02051

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FUKUNAGA B ET AL: "Identification of Functional Domains of the Aryl Hydrocarbon Receptor" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol. 270, no. 48, 8 décembre 1995 (1995-12-08), pages 29270-29278, XP002129578 ---	
A	EP 0 316 717 A (DAIICHI SEIYAKU CO) 24 mai 1989 (1989-05-24) ---	
A	WO 97 44475 A (LUSKY MONIKA ;MEHTALI MAJID (FR); LEROY PIERRE (FR); TRANSGENE SA) 27 novembre 1997 (1997-11-27) ---	
A	WO 96 30512 A (BRACCO LAURENT ;TOCQUE BRUNO (FR); RHONE POULENC RORER SA (FR); SC) 3 octobre 1996 (1996-10-03) ---	
A	OLIGINO T ET AL: "Drug inducible transgene expression in brain using a herpes simplex virus vector" GENE THERAPY, vol. 5, no. 4, avril 1998 (1998-04), page 491-496 XP002104570 -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

L. .ande internationale n°  
PCT/FR 99/02051

**Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup>  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup>  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup>  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☒ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Système d'expression inductible comprenant les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel et un vecteur adénoviral recombinant comportant un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé par ledit activateur transcriptionnel, ledit système caractérisé en ce que ledit activateur transcriptionnel est GRdex; vecteur adénoviral recombinant comprenant les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriées à leur expression et un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé par ledit activateur transcriptionnel; ledit vecteur adénoviral caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques codent pour ledit activateur transcriptionnel; particule virale infectieuse, procédé de préparation de ladite particule, cellule eucaryote comprenant ledit système d'expression, composition pharmaceutique, et utilisation dudit système.

2. revendications: 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Identique au sujet 1, mais ledit activateur transcriptionnel étant ER-T.

3. revendications: 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Identique au sujet 1, mais ledit activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un DLL dérivé du récepteur à l'ecdysone, un domaine de liaison à l'ADN hybride dérivé de ceux des récepteurs EcR and GR, et un domaine de transactivation dérivé de la protéine virale VP16, et un second polypeptide dérivé de la protéine USP de drosophile ou d'un homologue.

4. revendications: 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Identique au sujet 1, mais ledit activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide comportant un domaine de

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

liaison à l'ADN dérivé de ZFHD1 et un DLL dérivé de FKBP12, et un second polypeptide comportant un domaine de transactivation dérivé de p65 et un DLL dérivé de FRAP.

5. revendications: 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Identique au sujet 1, mais ledit activateur transcriptionnel comprenant un premier polypeptide dérivé de AhR et un second polypeptide dérivé de Arnt.

6. revendications: 20-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Vecteur adénoviral recombinant comprenant les séquences nucléotidiques codant pour un activateur transcriptionnel placées sous le contrôle des éléments de régulation appropriées à leur expression et un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur inductible susceptible d'être activé par ledit activateur transcriptionnel; ledit vecteur caractérisé en ce que lesdites séquences nucléotidiques codent pour le polypeptide tTA; particule virale infectieuse, procédé de préparation de ladite particule, cellule eucaryote comprenant ledit système d'expression, composition pharmaceutique, et utilisation dudit système.

7. revendications: 5, 34 (totalement) et 1-4, 6-33 (toutes partiellement, pour autant qu' applicables)

Identique au sujet 1, mais ledit activateur transcriptionnel comprenant un DLL et un domaine de transactivation dérivé d'un récepteur stéroïdien et un domaine de liaison à l'ADN hétérologue notamment dérivé de la protéine de levure Gal4.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs membres de familles de brevets

Dem. de Internationale No  
PC./FR 99/02051

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9837185 A	27-08-1998	AUCUN	
WO 9731108 A	28-08-1997	FR 2745008 A AU 707684 B AU 2098997 A CA 2247517 A EP 0896620 A	22-08-1997 15-07-1999 10-09-1997 28-08-1997 17-02-1999
WO 9738117 A	16-10-1997	AU 2557297 A CA 2251466 A CN 1215432 A EP 0910652 A	29-10-1997 16-10-1997 28-04-1999 28-04-1999
EP 0316717 A	24-05-1989	AT 101198 T CA 1309044 A DE 3887635 D DE 3887635 T ES 2061604 T JP 2000466 A JP 2826114 B US 5646013 A US 5534419 A	15-02-1994 20-10-1992 17-03-1994 01-06-1994 16-12-1994 05-01-1990 18-11-1998 08-07-1997 09-07-1996
WO 9744475 A	27-11-1997	FR 2748753 A AU 3036197 A	21-11-1997 09-12-1997
WO 9630512 A	03-10-1996	FR 2732348 A AU 5402096 A BR 9607928 A CA 2214451 A CZ 9703080 A EP 0817845 A HU 9801221 A JP 11503011 T NO 974449 A SK 131197 A ZA 9602506 A	04-10-1996 16-10-1996 09-06-1998 03-10-1996 14-01-1998 14-01-1998 28-08-1998 23-03-1999 26-09-1997 06-05-1998 01-10-1996